



TESIS SK-2402

**PROFIL FERMENTASI SUKROSA MENJADI
SORBITOL OLEH *Zymomonas mobilis* DENGAN
PENAMBAHAN KATION LOGAM DIVALEN Zn^{2+}**

Teta Mumtaz Kurniasari
NRP.1409201009

Dosen Pembimbing:
Prof. Dr. Surya Rosa Putra, MS

**PROGRAM MAGISTER KIMIA
BIDANG KEAHLIAN KIMIA HAYATI
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2012**



THESES SK-2402

**FERMENTATION PROFILE OF SUCROSE INTO
SORBITOL BY *Zymomonas mobilis* WITH
THE ADDITION OF DIVALEN METAL CATION Zn^{2+}**

Teta Mumtaz Kurniasari
NRP.1409201009

Dosen Pembimbing:
Prof. Dr. Surya Rosa Putra, MS

**MAGISTER CHEMISTRY PROGRAMME
ORGANIC CHEMISTRY
CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2012**

FERMENTATION PROFILE OF SUCROSE INTO SORBITOL BY *Zymomonas mobilis* WITH THE ADDITION OF DIVALENT METAL CATION Zn^{2+}

By : Teta Mumtaz Kurniasari

Student Identity Number: 1409201009

Supervisor : Prof. Dr. Surya Rosa Putra, MS.

ABSTRACT

Zymomonas mobilis is a gram negative, rod shape and anaerobe facultative bacteria which fermented glucose, fructose and sucrose through Etner-Doudoroff pathway producing ethanol and major by product sorbitol. The sorbitol production could be maximized by inhibiting the enzyme on the pathway to ethanol production so it will make the by product such as sorbitol increased. The inhibition is done by adding divalent metal cation Zn^{2+} in the form of 1,0 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ into the fermentation medium. Fermentation will use batch system, sucrose as the substrate 300 g/l, fermentation temperature 39°C and agitation speed 120 rpm. The sorbitol will be determined each at time interval 10, 30 and 48 hours. The sorbitol will be analyzed using GC-MS after derivatitation process using BSTFA. The addition of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ has been proved to inhibit the formation of ethanol. The ethanol yield decreased by increasing fermentation time. Ethanol yield in control media is eight times bigger than the ethanol in the media with the addition of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. The addition of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ not only inhibited the formation of ethanol but it also inhibited the *Z. mobilis* biomass production. Sorbitol was found neither in the control media nor in the media with the addition of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. The other compound which is found was 1,1-dioktil sorbitol. In the control media, the formation of 1,1-dioktil sorbitol decreased by increasing fermentation time while the ethanol yield is increasing. In the media with the addition of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, the ethanol and 1,1-dioktil sorbitol is decreasing by increasing of fermentation time. It is suspected that there is levan formation which is increasing by increasing of fermentation time.

Key words: sorbitol, sucrose, *Zymomonas mobilis*, divalent metal cation Zn^{2+}

PROFIL FERMENTASI SUKROSA MENJADI SORBITOL OLEH *Zymomonas mobilis* DENGAN PENAMBAHAN KATION LOGAM DIVALEN Zn^{2+}

Nama Mahasiswa : Teta Mumtaz Kurniasari

NRP : 1409201009

Pembimbing: Prof. Dr. Surya Rosa Putra, MS.

ABSTRAK

Zymomonas mobilis merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan bersifat anaerob fakultatif yang menfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa melalui jalur Etner-Doudoroff menghasilkan etanol dan produk samping utama berupa sorbitol. Pemaksimalan hasil sorbitol dapat dicapai dengan cara menghambat enzim-enzim yang mengarah pada pembentukan etanol sehingga produk samping utama berupa sorbitol akan meningkat. Penghambatan dilakukan dengan penambahan ion logam divalen Zn^{2+} dalam bentuk $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sebesar 1,0 g/l. Fermentasi dilakukan menggunakan sistem *batch*, substrat sukrosa 300 g/l, temperatur 39°C dan kecepatan pengadukan 120 rpm. Sorbitol yang dihasilkan diukur pada interval 10, 30 dan 48 jam. Analisa sorbitol dilakukan menggunakan GC-MS setelah proses derivatisasi menggunakan BSTFA. Penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ terbukti menghambat pembentukan etanol Yield etanol semakin menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi. Yield etanol pada media kontrol dengan waktu fermentasi 48 jam nilainya 8 kali lebih besar daripada yield etanol dalam medium dengan penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ tidak hanya menghambat pembentukan etanol akan tetapi juga menghambat pertumbuhan biomassa *Z. mobilis*. Sorbitol tidak ditemukan baik dalam medium kontrol maupun medium dengan penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Akan tetapi ditemukan senyawa 1,1-dioktil sorbitol. Pembentukan dioktil sorbitol semakin menurun dengan bertambahnya waktu fermentasi di dalam medium kontrol dan sebaliknya jumlah etanolnya semakin meningkat. Pembentukan dioktil sorbitol maupun etanol semakin menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi di dalam medium dengan penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, hal ini diduga disebabkan terbentuknya levan yang semakin meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi.

Kata kunci: sorbitol, sukrosa, *Zymomonas mobilis*, kation logam divalent Zn^{2+}

Telah disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Kimia
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

Teta Muntaz Kurniasari

Nrp. 1409201009

Tanggal Ujian : 29 Februari 2012

Periode Wisuda : Maret 2012

Disetujui oleh:

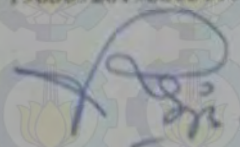
1.


Prof. Dr. Surya Rosa Putra, MS.

(Pembimbing)

Nip: 196309281988031001

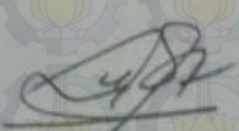
2.


Prof. Dr. R. Y. Perry Burhan, MSc.

(Penguji)

Nip: 195902151987011001


3.


Prof. Dr. Mardi Santoso, PhD.

(Penguji)

Nip: 196501311989101001


4.


Dr. Fahimah Martak, MSI.

(Penguji)

NIP. 19660703 199102 2001

Direktur Program Pascasarjana,


Prof. H. H. Adi Supriyanto, MT.
NIP. 196404081990021001

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1. 1 Latar Belakang.....	1
1. 2 Permasalahan.....	2
1. 3 Tujuan Penelitian.....	2
1. 4 Manfaat Penelitian	3
 BAB 2 KAJIAN PUSTAKA	
2. 1 gula alkohol (poliol).....	5
2.1.1 Sorbitol	5
2. 2 Sukrosa.....	6
2. 3 <i>Zymomonas mobilis</i>	7
2. 4 Produksi sorbitol dan etanol oleh <i>Zymomonas mobilis</i>	8
2. 5 Enzim glukosa-fruktosa oksireduktase	10
2. 6 Kurva pertumbuhan bakteri.....	11
2. 7 Cara perhitungan jumlah dan massa sel.....	13
2. 8 Identifikasi morfologi pada bakteri	15
2. 9 Isolasi bakteri menggunakan teknik pengenceran.....	17
2. 10 Analisis gula menggunakan GC-MS	20
 BAB 3 METODE PENELITIAN	
3. 1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	23
3. 2 Alat dan Bahan	23

3.3	Prosedur Kerja	24
3.3.1	Pembuatan media regenerasi <i>Zymomonas mobilis</i>	24
3.3.2	Identifikasi morfologi <i>Zymomonas mobilis</i>	24
3.3.3	Penentuan efek aerasi pada pertumbuhan <i>Zymomonas mobilis</i>	29
3.3.4	Penentuan konsentrasi optimum sukrosa	29
3.3.5	Pembuatan inokulum <i>Zymomonas mobilis</i>	30
3.3.6	Proses fermentasi produksi sorbitol dengan dan tanpa penambahan kation logam Zn^{2+}	30
3.3.7	Metode Analisa	31
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Identifikasi morfologi <i>Zymomonas mobilis</i> galur liar	35
4.1.1	Uji kemurnian kultur <i>Zymomonas mobilis</i> pada media agar miring dengan pengamatan secara makroskopis	35
4.1.2	Identifikasi morfologi <i>Z. mobilis</i> secara makroskopis	36
4.1.3	Uji aspek biokimia <i>Z. mobilis</i> galur liar	36
4.2	Efek aerasi terhadap pertumbuhan <i>Z. mobilis</i> galur liar	44
4.3	Pembuatan inokulum <i>Z. mobilis</i>	45
4.4	Pemilihan konsentrasi sukrosa	46
4.5	Penentuan pola fermentasi sukrosa menjadi etanol	48
4.6	Penentuan jumlah biomassa <i>Z. mobilis</i> galur liar dengan dan tanpa penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	50
4.7	Penentuan pola fermentasi sukrosa menjadi sorbitol	52
4.8	Senyawa selain sorbitol yang terdapat dalam supernatan hasil fermentasi berdasarkan data GC-MS	56
BAB V KESIMPULAN		
5.1	Kesimpulan	67
5.2	Saran	68
DAFTAR PUSTAKA		69
LAMPIRAN		75

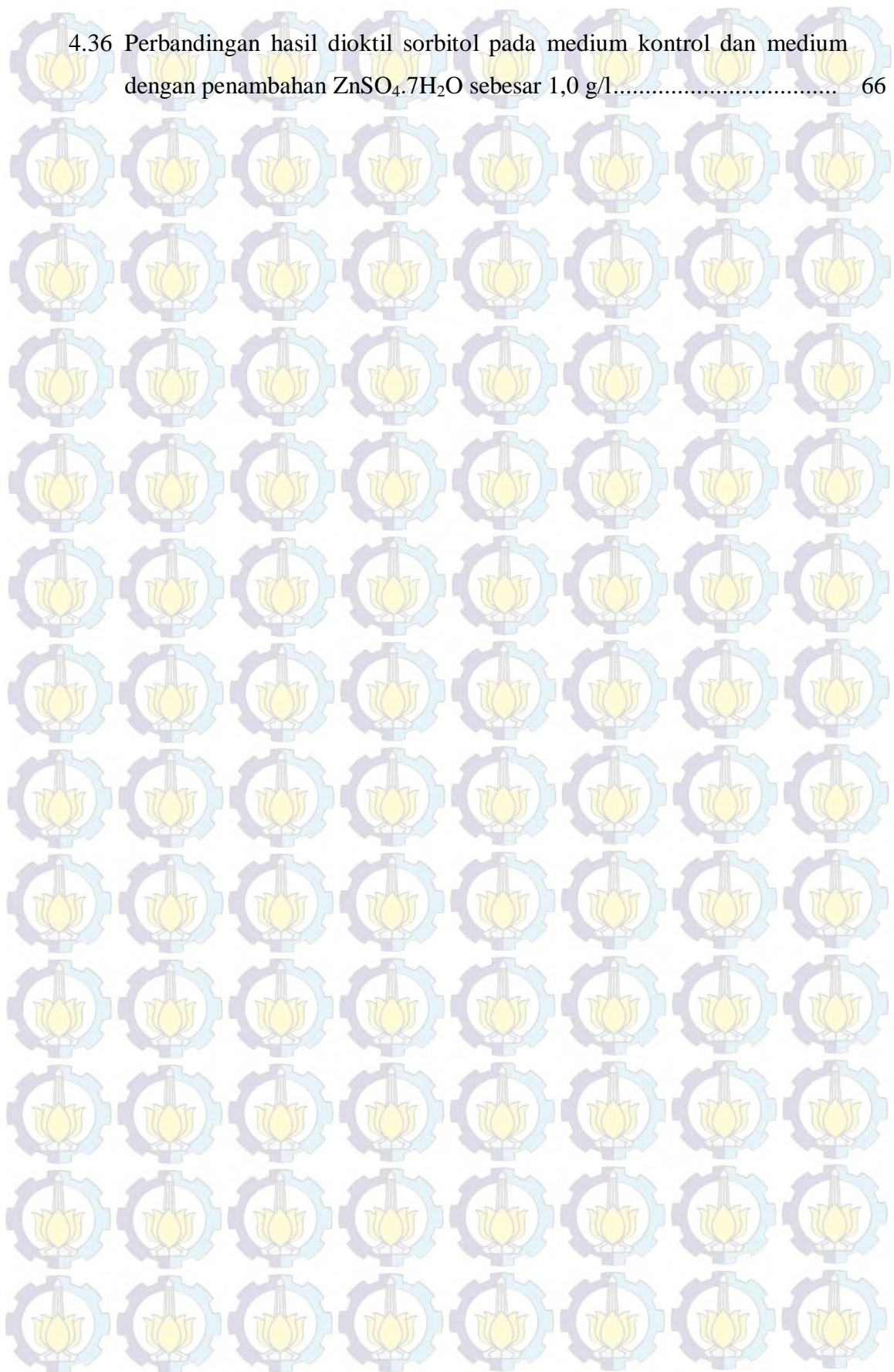
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Yield g etanol/g glukosa antara kontrol dan penambahan Zn	49
4.2 Jumlah senyawa dalam medium kontrol dan medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sampel pada waktu fermentasi 10, 30, dan 48 jam).....	57
4.3 Puncak senyawa yang dapat diidentifikasi pada kromatogram GCMS pada waktu fermentasi 10, 30 dan 48 jam	58
4.4 Hubungan antara waktu fermentasi dan kadar senyawa hidroksimetilfurfural (HMF)	60
4.5 Hubungan antara kadar glucopyranose terhadap waktu fermentasi	61
4.6 Hubungan antara waktu inkubasi dan kadar dioktil sorbitol	62
4.7 Hubungan antara produktivitas dioktil sorbitol terhadap waktu fermentasi	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Konversi fruktosa menjadi sorbitol.....	5
2.2 Struktur molekul sukrosa.....	6
2.3 Metabolisme glukosa dan fruktosa dalam <i>Zymomonas mobilis</i>	9
2.4 Penghambatan enzim oleh ion logam dalam jalur Etner-Doudorof.....	10
2.5 Kurva pertumbuhan bakteri.....	11
2.6 Sifat koloni berdasarkan ukurannya.....	16
2.7 Sifat koloni berdasarkan bentuk koloni dari atas.....	16
2.8 Sifat koloni berdasarkan bentuk tepi koloni	16
2.9 Sifat koloni berdasarkan kenaikan permukaan koloni	16
2.10 Bentuk koloni pada agar-agar miring.....	16
2.11 Bentuk koloni pada tusukan gelatin, gelatin tidak termakan.....	17
2.12 Teknik cawan gores.....	18
2.13 Teknik inokulasi pada cawan sebar menggunakan stik perata.....	18
2.14 Teknik cawan tuang	19
2.15 Teknik mencampur koloni metode cawan tuang	19
4.1 Teknik cawan gores 16 goresan.....	35
4.2 Bentuk koloni.....	36
4.3 Kultur 24 jam perbesaran 500x.....	37
4.4 Hasil uji pewarnaan spora perbesaran 1000x	37
4.5 Uji kebutuhan oksigen.....	38
4.6 Uji oksidase	39
4.7 Uji katalase	39
4.8 Uji fermentasi karbohidrat sukrosa, fruktosa, laktosa dan mannitol.....	40
4.9 Uji pembentukan H ₂ S dan motilitas.....	41
4.10 Sistein desulfhydrase.....	41
4.11 Hasil uji indol.....	43
4.12 Uji metil merah	43
4.13 Uji Voges-Proskauer	44

4.14	Kurva pertumbuhan dengan efek aerasi dan tanpa aerasi	45
4.15	Perbandingan hasil etanol pada beberapa konsentrasi sukrosa oleh <i>Z. mobilis</i> galur liar selama proses fermentasi 24 jam	47
4.16	Destilasi supernatan menggunakan kolom vigreux	47
4.17	Perbandingan hasil fermentasi <i>Zymomonas mobilis</i> galur liar antara kontrol dan penambahan Zn pada waktu fermentasi 48 jam	49
4.18	Perbandingan %etanol dan % gula residu pada media fermentasi kontrol dan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 1 g/l dengan variasi waktu fermentasi 10, 30 dan 48 jam	50
4.19	Pola pertumbuhan sel <i>Zymomonas mobilis</i> galur liar tanpa dan dengan penambahan Zn^{2+}	51
4.20	Kurva pertumbuhan <i>Zymomonas mobilis</i> antara kontrol dan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 2,0 g/l dengan penentuan secara turbidimetri	51
4.21	Reaksi pembentukan turunan trialkilsilyl pada gugus fungsi hidroksil	52
4.22	Kromatogram GC sorbitol	52
4.23	Kromatogram MS sorbitol	53
4.24	Pola fragmentasi sorbitol	53
4.25	Supernatan setelah penambahan metanol dan disentrifus	54
4.26	Kromatogram GC medium kontrol dengan waktu inkubasi 10 jam	56
4.27	Kromatogram GC medium sampel dengan waktu inkubasi 10 jam	57
4.28	5-hidroksimetilfurfural	58
4.29	Ringkasan reaksi Maillard	59
4.30	Silanol trimetilfosfat	60
4.31	β -D-glucopyranose	61
4.32	Mekanisme pembentukan ion dalam 1,2,3,4,6-pentakis-O-trimetilsilyl heksopyranose (Glucopyranose)	61
4.33	1,1-C-dioktil 2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilil-sorbitol	62
4.34	Pola kurva yield etanol dan produktivitas dioktil sorbitol pada medium kontrol	63
4.35	Pola kurva yield etanol dan produktivitas dioktil sorbitol pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	64



4.36 Perbandingan hasil dioktil sorbitol pada medium kontrol dan medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 1,0 g/l..... 66

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur ke hadirat Allah SWT penulis dapat menyelesaikan proposal tesis yang berjudul **“Profil Fermentasi Sukrosa menjadi Sorbitol oleh *Zymomonas mobilis* dengan Penambahan Kation Logam divalent Zn^{2+} ”** yang merupakan salah satu syarat untuk melaksanakan penelitian dalam rangka penulisan Tesis Program Pasca Sarjana Kimia, di jurusan kimia, FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dengan selesainya proposal tesis ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Surya Rosa Putra M.S. selaku dosen pembimbing sekaligus dosen wali serta kepala laboratorium Biokimia yang telah mencurahkan segenap tenaga dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis hingga selesainya proposal tesis ini.
2. Koordinator Program Magister Kimia yang telah membantu memberikan fasilitas selama penelitian.
3. Segenap keluarga besar yang telah membantu dalam upaya penyelesaian proposal ini.
4. Rekan-rekan tugas akhir dan tesis S1 dan S2 Kimia ITS khususnya di laboratorium Biokimia.

Penulis telah berusaha menyelesaikan proposal ini dengan segenap kemampuan dalam diri. Apabila terdapat kekurangan maka dapat dijadikan masukan untuk perbaikan di lain waktu.

Surabaya, Oktober 2011

Penulis

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alur prosedur kerja	75
2. Kurva Pertumbuhan <i>Zymomonas mobilis</i> galur liar jepang	76
3. Perhitungan residu glukosa.....	78
4. Perhitungan kadar etanol.....	80
5. Perhitungan jumlah biomassa.....	82
6. Perhitungan Yield dan Produktivitas (Laju Pembentukan) Etanol.....	83
7. Perhitungan Kemampuan Bakteri Memproduksi Etanol	84
8. Tabel data waktu retensi dan kadar senyawa hasil derivatisasi pada medium kontrol.....	85
9. Tabel data waktu retensi dan kadar senyawa hasil derivatisasi pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,0 g/l.....	87
10. Kromatogram MS senyawa 5-hidroksimetilfurfural.....	89
11. Kromatogram MS senyawa silanoltrimetilfosfat.....	90
12. Kromatogram MS senyawa 1,1-di-C-oktil-2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilyl-D-sorbitol.....	91
13. Kromatogram MS senyawa D-1,2,3,4,6-pentakis-O-trimetilsilyl-heksopyranose (glucopyranose).....	92
14. Kromatogram MS Sorbitol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 10 jam.....	93
15. Kromatogram GC Sorbitol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 10 jam.....	94
16. Kromatogram GC Sorbitol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 30 jam.....	95
17. Kromatogram GC Sorbitol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 30 jam.....	96
18. Kromatogram GC Sorbitol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 48 jam.....	97

19. Kromatogram GC Sorbitol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 48 jam.....	98
20. Kromatogram GC etanol pada medium sukrosa 200 g/l dengan waktu inkubasi 24 jam.....	99
21. Kromatogram GC etanol pada medium sukrosa 250 g/l dengan waktu inkubasi 24 jam.....	100
22. Kromatogram GC etanol pada medium sukrosa 300 g/l dengan waktu inkubasi 24 jam.....	101
23. Kromatogram GC etanol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 10 jam.....	102
24. Kromatogram GC etanol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 10 jam.....	103
25. Kromatogram GC etanol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 30 jam.....	104
26. Kromatogram GC etanol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 30 jam.....	105
27. Kromatogram GC etanol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 48 jam.....	106
28. Kromatogram GC etanol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 48 jam.....	107

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Zymomonas mobilis, bakteri gram negatif penghasil etanol, merupakan bakteri anaerobik fakultatif yang memfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa mengikuti jalur Etner-Doudoroff (Schlegel, 1994). Produksi etanol dari fermentasi batch pada medium glukosa atau fruktosa dapat mencapai sebesar 94% yield teoritis akan tetapi konversi pada medium sukrosa dapat menurun menjadi sebesar 70% yield teoritis (Doelle, 1982). Penurunan yield etanol yang dihasilkan oleh *Z. mobilis* pada medium sukrosa atau campuran glukosa dan fruktosa dikarenakan terbentuknya produk samping utama yakni sorbitol (Barrow dkk, 1984). Selain sorbitol, produk samping lain yang terbentuk adalah levan, mannitol, asetaldehid, dihidroksiaseton dan gliserol.

Fokus penelitian ini adalah upaya pengendalian metabolisme sukrosa menuju sorbitol karena sorbitol merupakan produk samping utama dan banyak menjadi minat penelitian karena nilai ekonominya. Jalur pembentukan sorbitol dalam *Z. mobilis* melibatkan oksidasi glukosa menjadi glukonat dan disertai dengan reduksi fruktosa menjadi sorbitol lewat sistem enzim glukosa-fruktosa oksireduktase. Sukrosa dalam *Zymomonas* dipecah menjadi glukosa dan fruktosa kemudian fruktosa pertama difosforilasi oleh fruktokinase menghasilkan fruktosa-6-fosfat lalu diisomerisasi menjadi glukosa-6-fosfat oleh hexosephosphataseisomerase sedangkan glukosa difosforilasi oleh glukokinase menjadi glukosa-6-fosfat (Swings dan Deley, 1977). Glukosa-6-fosfat inilah yang kemudian dalam jalur Etner-Doudoroff diubah menjadi etanol lewat serangkaian reaksi oleh beberapa enzim.

Pengendalian jalur metabolisme sukrosa menuju metabolit tertentu dapat dilakukan dengan mengaktifkan jalur metabolisme menuju hasil yang diinginkan atau menghambat jalur metabolisme menuju produk yang tidak diinginkan. Penambahan kation logam divalen dapat mengubah jalur biosintesis etanol ke jalur produksi sorbitol dengan cara menonaktifkan atau menghambat enzim yang terlibat dalam biosintesis etanol dalam jalur Etner-Doudoroff. Ion logam divalen

yang memiliki efek penghambatan tersebut antara lain adalah Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ag^{2+} , Be^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{2+} , Hg^{2+} , Li^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zr^{2+} dan Sr^{2+} . Di antara ion logam tersebut, Zn^{2+} merupakan ion logam divalen yang paling efektif dalam menghambat enzim yang mengarah pada pembentukan etanol meskipun pada penambahan dengan kadar rendah (Chang, 2009). Enzim GFOR di lain pihak tidak dipengaruhi oleh hampir semua ion logam tersebut. Hal ini menunjukkan keunikan dari enzim GFOR dimana penambahan ion logam divalen dengan jumlah tertentu dapat menghambat jalur biosintesis etanol sehingga akan mengarah ke biosintesis sorbitol (Liu dkk., 2010).

Profil fermentasi *Z. mobilis* galur liar akibat penambahan ion logam divalen Zn^{2+} dalam bentuk $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pada substrat sukrosa belum diteliti. Fokus penelitian ini adalah mengkaji efek penambahan ion logam divalen Zn^{2+} sebesar 1,0 g/l terhadap metabolisme sukrosa dengan beberapa pengaturan kondisi fermentasi. Konsentrasi sukrosa 300 g l⁻¹, temperatur inkubasi 39°C, dan kecepatan pengadukan 120 rpm. Sorbitol akan diukur pada interval 10, 30 dan 48 jam. Kadar sorbitol ditentukan menggunakan peralatan GC-MS.

1.2 Permasalahan

Zymomonas mobilis galur liar koleksi laboratorium biokimia ITS baru diteliti profil produksi etanolnya pada berbagai substrat. Etanol merupakan produk utama dari *Z. mobilis* sedangkan pengendalian metabolisme sukrosa ke arah sorbitol belum diteliti. Fokus penelitian ini adalah untuk meneliti profil produksi sorbitol oleh *Z. mobilis* akibat penambahan ion logam divalen Zn^{2+} dalam bentuk $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ terhadap substrat sukrosa.

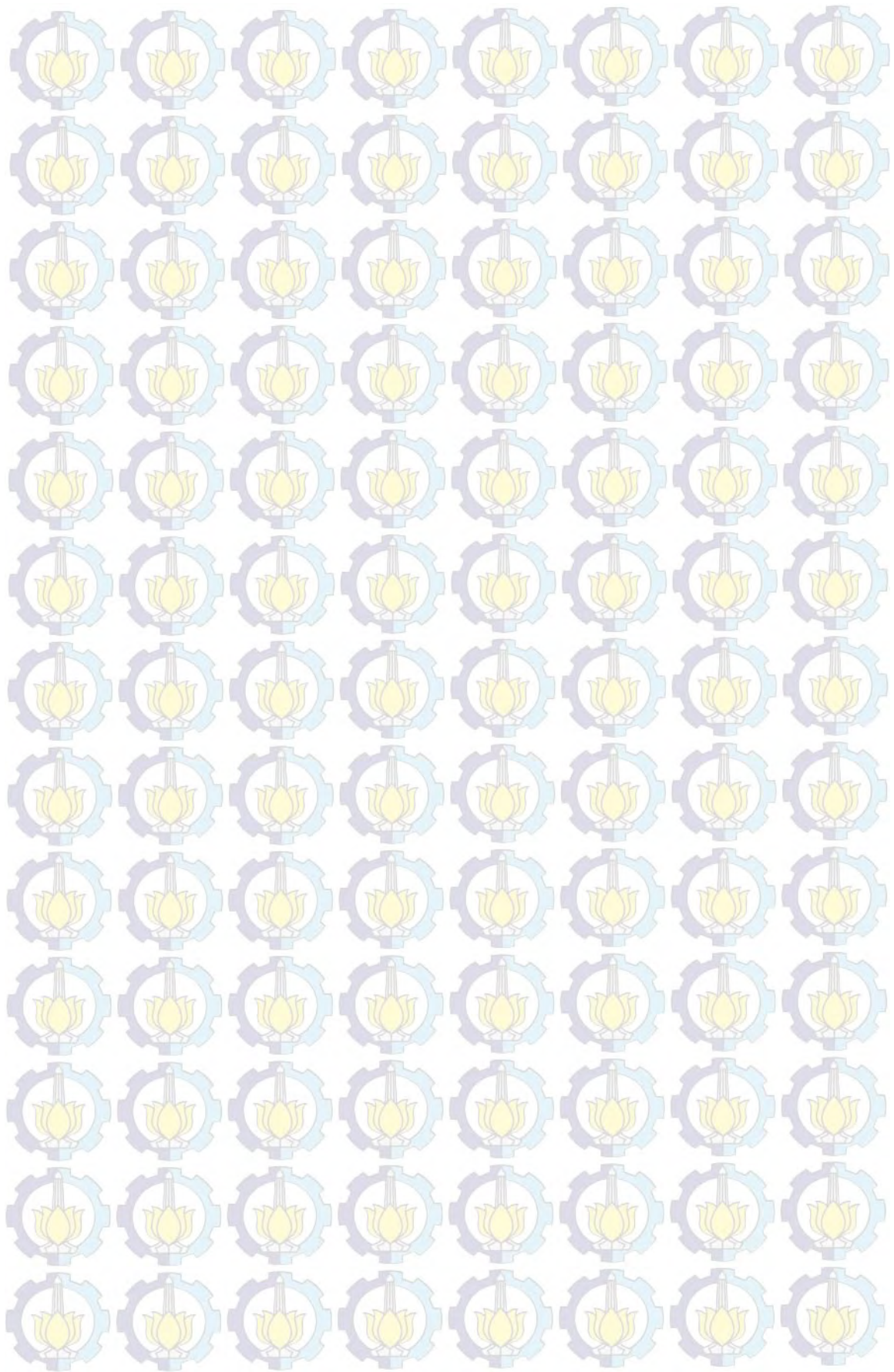
1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melengkapi profil fermentasi *Zymomonas mobilis* galur liar koleksi laboratorium biokimia ITS dan mengendalikan metabolisme sukrosa oleh *Zymomonas mobilis* dengan penambahan kation logam divalen Zn^{2+} dalam bentuk $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.



1.4 Manfaat Penelitian

- 1) Hasil penelitian ini dapat melengkapi profil fermentasi *Zymomonas mobilis* galur liar koleksi laboratorium biokimia ITS dan menghasilkan sorbitol.
- 2) Manfaat aplikatif yakni untuk mengoptimalkan fermentasi dioktil sorbitol.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

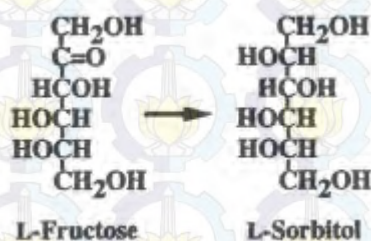
2.1 Gula alkohol (poliol)

Poliol dapat dibedakan dari sakarida lainnya oleh reduksi gugus aldehid atau ketonnya. Beberapa poliol terdapat di alam, khususnya terdapat dalam buah dan sayuran, akan tetapi karena hasil ekstraksinya tidak memuaskan maka mereka dibuat secara industri dengan hidrogenasi katalitik sakarida yang bersangkutan. Substitusi dari gugus aldehid atau keton menjadi gugus alkohol mengubah bentuk sikliknya menjadi bentuk linear, sehingga menyebabkan stabilitas kimiawinya lebih tinggi, afinitas terhadap air lebih tinggi, kemampuan untuk mengkristal lebih rendah dan tidak adanya reaksi Maillard.

Berdasarkan strukturnya, poliol dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok, antara lain: (1) Monosakarida terhidrogenasi, yaitu sorbitol, mannitol dan xylitol, (2) Disakarida terhidrogenasi, yaitu isomalt, maltitol dan laktitol, (3) Campuran sakarida terhidrogenasi dan polisakarida, yaitu: sirup glukosa terhidrogenasi (Marie dan Piggot, 1991).

2.1.1 Sorbitol

Sorbitol diisolasi dari beri di pegunungan abu untuk pertama kalinya pada tahun 1872 oleh Joseph Boussingault. Senyawa alami ini terdapat dalam banyak buah, khususnya dalam buah pir dan ceri serta beberapa minuman fermentasi seperti cider (5-6 g/l).



Gambar 2.1 Konversi fruktosa menjadi sorbitol (Sasahara dan Izumori, 2005)

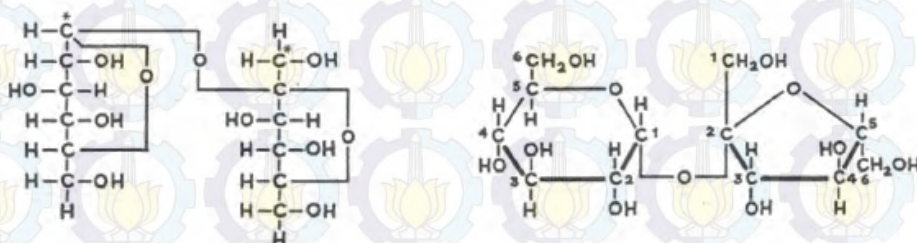
Proses produksi sorbitol yang umum digunakan adalah hidrogenasi katalitik glukosa yang telah diturunkan dari pati atau dari gula invert. Glukosa

dihidrogenasi pada 120°C dengan adanya katalis (Raney nikel). Larutan yang diperoleh kemudian didemineralisasi pada resin penukar ion, dimurnikan dan dipekatkan. Hasil hidrogenasi tersebut adalah campuran 70% sorbitol dan 30% mannitol. Metode lain yang sedang dipelajari berdasarkan kemampuannya untuk menghasilkan sorbitol adalah *Zymomonas mobilis* dari substrat sukrosa (Marie dan Piggot, 1991). Pada *Zymomonas mobilis* fruktosa dapat diubah menjadi sorbitol (Gambar 2.1) dengan adanya enzim GFOR (Zachariou dan Scopes, 1986).

Sorbitol memiliki sifat berupa bubuk kristal putih, tak berbau dengan rasa yang manis, mempunyai densitas sebesar 1,47 pada -5°C, titik lelehnya adalah 93°C (bentuk metastabil) sedangkan bentuk stabilnya memiliki titik leleh sebesar 97,5°C dan titik didihnya sebesar 105°C. Sorbitol larut dalam air, sedikit larut dalam metanol, etanol, asam asetat, fenol dan asetamida serta hampir tak larut dalam pelarut organik lainnya. Sorbitol memiliki beberapa kegunaan dalam makanan antara lain sebagai bahan pengering, emulsifier, bahan pemanis, bahan pengental, bahan penstabil, bahan pemberi tekstur dan lain sebagainya (Lewis, 1989).

2.2 Sukrosa

Sukrosa termasuk disakarida yang disusun oleh glukosa dan fruktosa. Berbeda dengan kebanyakan disakarida dan oligosakarida, sukrosa tidak mempunyai atom karbon hemiasetal dan hemiketal karena kedua atom karbon ini saling berikatan seperti terlihat pada Gambar 2.2, sehingga tidak memiliki sifat gula pereduksi, tidak mengadakan mutarotasi dan tidak bereaksi dengan fenilhidrasi.



Gambar 2.2 Struktur molekul sukrosa (Harper, 1973)

Sukrosa mudah dihidrolisis menjadi D-glukosa dan D-fruktosa. Hidrolisis ini biasanya disebut proses inversi dan akan diikuti perubahan rotasi optik dari kanan ke kiri, apabila telah tercapai campuran dalam jumlah yang sama antara glukosa dan fruktosa, campuran tersebut disebut gula invert (Girindra, 1990).

2.3 *Zymomonas mobilis*

Etanol merupakan produk fermentasi yang paling dikenal luas. Penghasil utama etanol adalah ragi, terutama dari *Saccharomyces cerevisiae*. Ragi merupakan organisme aerob, dengan ketiadaan oksigen, organisme ini menfermentasi karbohidrat menjadi etanol dan karbondioksida. Beberapa bakteri anaerob dan anaerob fakultatif juga menfermentasi heksosa dan pentosa menjadi etanol sebagai produk utama atau produk samping.

Salah satu bakteri anaerob fakultatif penghasil etanol yang potensial adalah *Z. mobilis*. *Z. mobilis* merupakan bakteri penghasil etanol yang diisolasi pertama kali di Meksiko dari *pulque*, (sari *Agave Americana*) yang tengah mengalami proses fermentasi. *Z. mobilis* merupakan bakteri mobil, berbentuk batang dan bercemeti polar. Bakteri ini menempuh jalur 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat (Jalur Etner-Doudoroff) dan memecah piruvat dengan enzim piruvat dekarboksilase menjadi asetaldehid dan karbondioksida. Asetaldehid kemudian direduksi menjadi etanol (Schlegel, 1994).

Z. mobilis memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan *S. cerevisiae*. *Z. mobilis* mampu tumbuh dalam medium dengan konsentrasi glukosa tinggi. Hal ini disebabkan karena terbentuknya sorbitol oleh enzim glukosa-fruktosa oksidoreduktase (GFOR) yang terletak pada periplasma bakteri *Z. mobilis* sehingga memberikan efek osmoproteksi terhadap tingginya kadar etanol yang dihasilkan (Loos, dkk., 1994).

Sel *Zymomonas* berbentuk batang, gram negatif, panjangnya 2-6 μm , lebarnya 1 - 1,4 μm dan biasanya ditemukan tunggal atau berpasangan. Beberapa galur *Zymomonas* ada yang bersifat motil dan ada juga yang tidak. Jika bersifat motil, *Zymomonas* memiliki satu hingga empat flagela polar, motilitas *Zymomonas* dapat hilang secara mendadak. Koloni dalam medium standar yang terdiri atas 0,5% yeast ekstrak, 2% glukosa dan 2% agar akan mempunyai

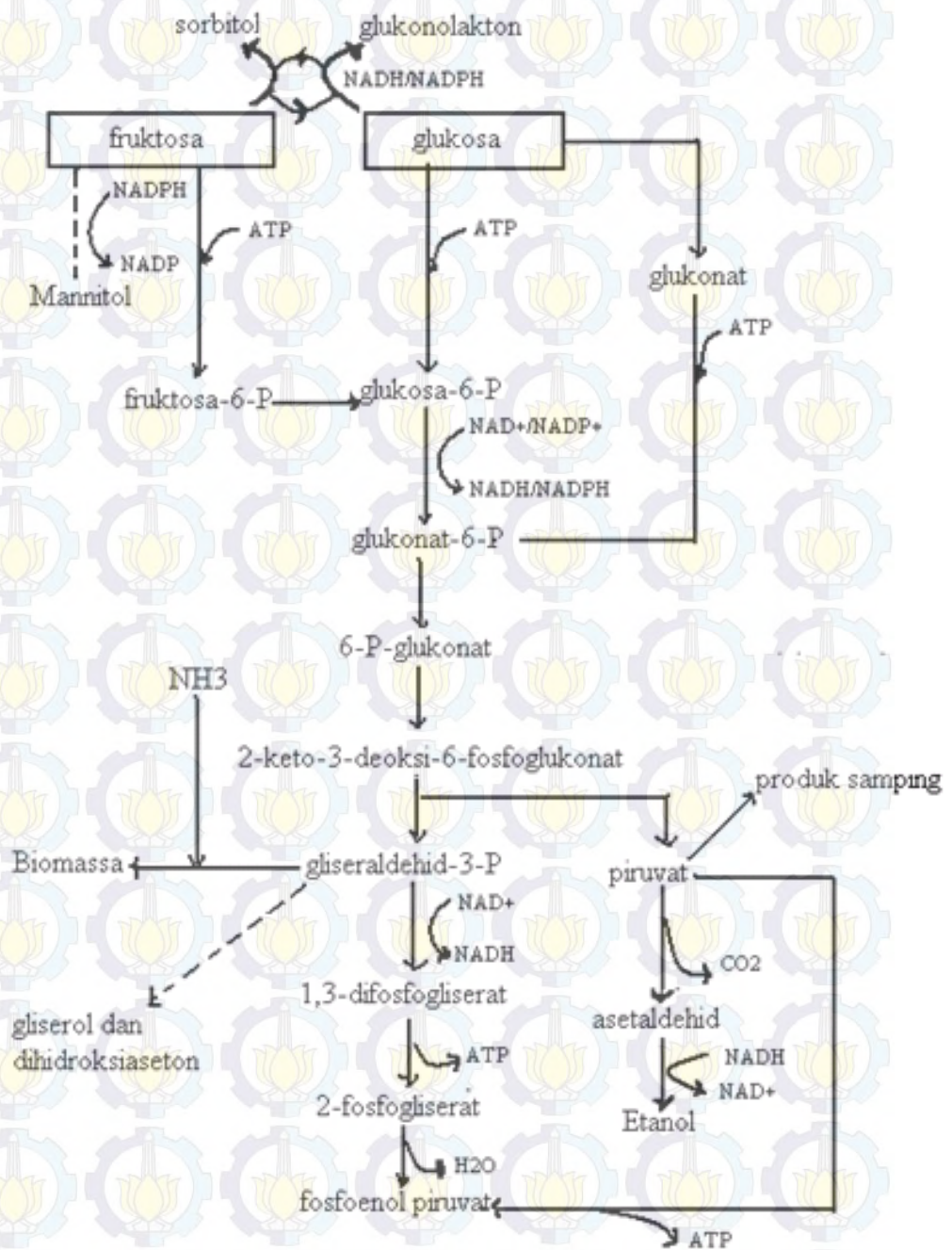
penampakan makroskopik mengkilat, berwarna putih atau krem, memiliki diameter 1 hingga 2 mm setelah 2 hari pada suhu 30°C. Tepi koloninya bulat utuh. Uji katalase positif. *Z. mobilis* tidak membentuk spora maupun kapsul. *Zymomonas* dapat menfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa menghasilkan etanol dan produk samping lainnya. *Z. mobilis* bersifat anaerob fakultatif. *Z. mobilis* tidak tumbuh maupun menfermentasi pati, laktosa, dan mannitol. Uji H₂S hasilnya bervariasi. Uji oksidasenya negatif. *Z. mobilis* tidak menghasilkan indol, tidak mereduksi nitrat dan tidak menghidrolisis gelatin (Swings dan De Ley, 1977).

2.4 Produksi sorbitol dan etanol oleh *Zymomonas mobilis*

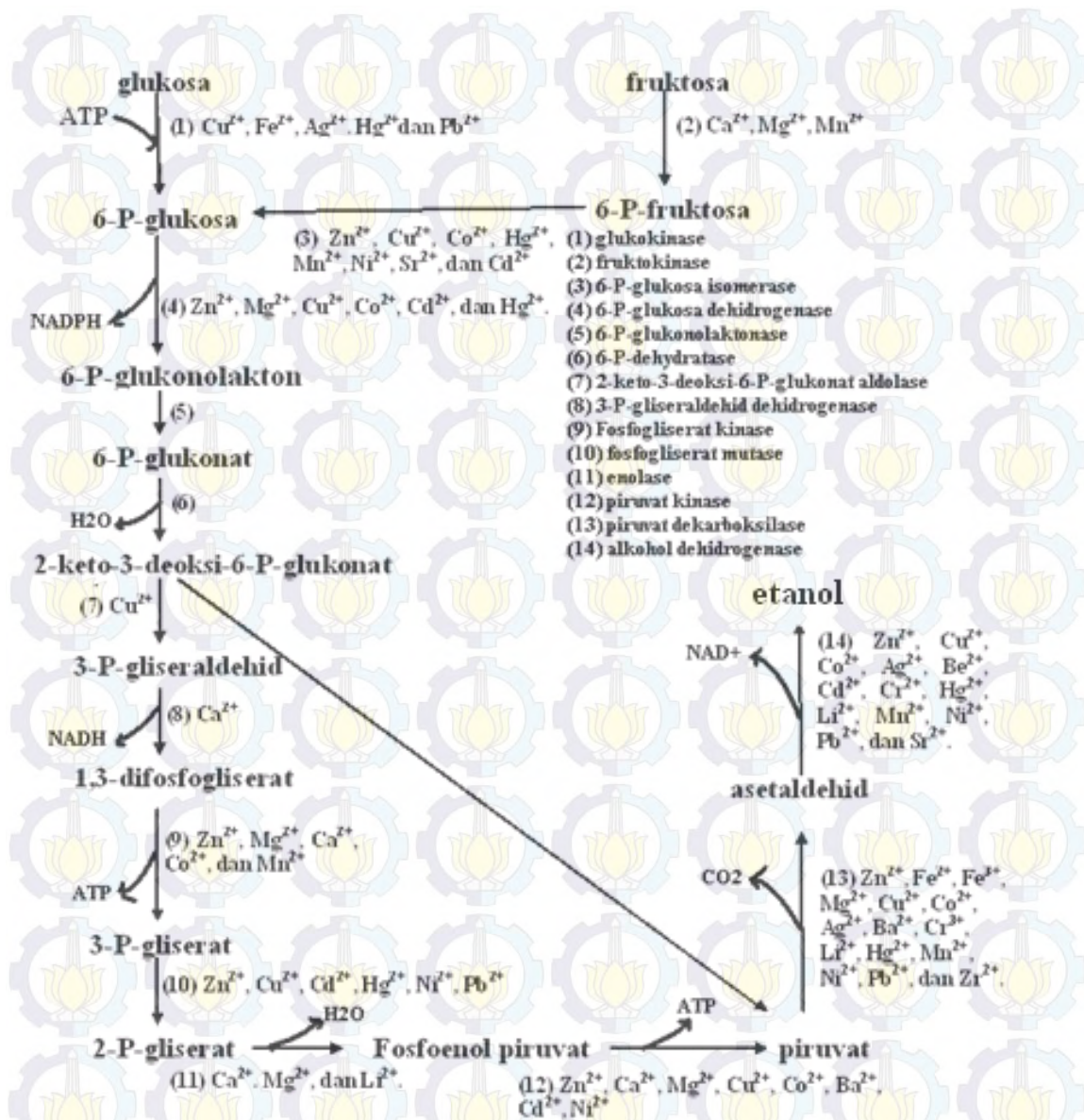
Sorbitol dihasilkan lewat jalur Etner-Doudoroff oleh enzim glukosa-fruktosa oksireduktase. Enzim glukosa-fruktosa oksireduktase (GFOR) yang terdapat pada periplasma bakteri akan mengubah glukosa menjadi glukonolakton dan fruktosa menjadi sorbitol. Enzim GFOR mempunyai sifat fisiologis yang sangat penting, sorbitol yang dihasilkan oleh enzim GFOR diakumulasi oleh bakteri untuk mencegah efek berbahaya yang disebabkan oleh tekanan osmotik yang tinggi akibat sel ditumbuhkan pada medium fermentasi dengan konsentrasi gula tinggi (Loos, dkk., 1994).

Jalur pembentukan sorbitol oleh *Zymomonas mobilis* dapat dilihat lewat jalur biosintesa pada Gambar 2.3. Penambahan kation logam dapat menghambat pembentukan etanol. Enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesa sorbitol dan etanol serta kation logam yang menghambatnya dapat dilihat pada Gambar 2.4. Berdasarkan database *Brenda-Enzyme* diketahui bahwa ion logam Zn²⁺ dalam bentuk ZnSO₄·7H₂O merupakan kation logam yang mempunyai efek terbesar dalam menghambat pembentukan etanol meskipun pada penambahan dengan kadar rendah (Liu, dkk., 2011). Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan kompleks koordinasi yang diperoleh dengan ion logam yang berbeda (Walaas, 1958). Ion logam yang berbeda diharapkan bergabung dengan pusat ligan yang berbeda dari enzim tersebut. Penghambatan enzim pada penambahan kation logam dengan konsentrasi tinggi disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi kompleks Logam²⁺--Enzim dengan adanya kation berlebih. Kompleks ini lebih

stabil daripada hasil aktivasi kompleks alaminya dan dapat mengakibatkan efek penghambatan (Walaas dan Walaas, 1962). Efek penghambatan oleh Zn^{2+} terbesar karena kompleks logam-enzim yang dibentuk lebih stabil dibandingkan kompleks logam-enzim dari kation yang lain (Chang, 2009).



Gambar 2.3 Metabolisme glukosa dan fruktosa dalam *Zymomonas mobilis* (Lee dan Huang, 2000).



Gambar 2.4 Penghambatan enzim oleh ion logam dalam jalur Etner-Doudoroff (Liu, dkk., 2011).

2.5 Enzim glukosa-fruktosa oksireduktase

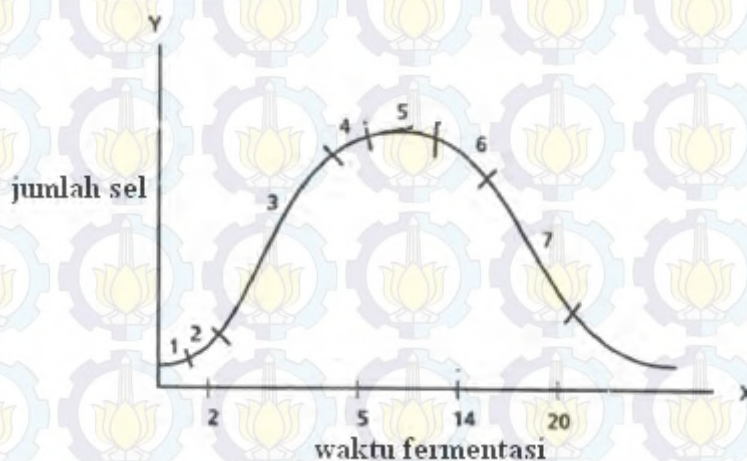
Nama trivial atau umum dari kebanyakan enzim adalah yang berbentuk “substrat-asa” atau “substrat-jenis reaksi-asa”, seringkali nama trivial tersebut tidak bersifat menguraikan. Pemberian nama secara sistematis dari enzim saat ini didasarkan atas Komisi Enzim Internasional (International Enzyme Commission) atau disebut juga system IEC yang diterima oleh International Union of Biochemistry. Klasifikasi enzim berdasarkan IEC antara lain: enzim oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase dan ligase.

Oksidoreduktase beredar antara bentuk oksidasi dan reduksinya jika molekul-molekul substrat secara berturut-turut dioksidasi. Terdapat dua jenis oksidoreduktase yakni dehidrogenase dan oksidase, keduanya dibedakan oleh sifat akseptor elektronnya. Dehidrogenase adalah enzim redoks yang tidak menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron. Oksidase adalah enzim redoks yang memakai oksigen sebagai akseptor elektron (Page, 1997).

Enzim oksidoreduktase yang terdapat dalam *Z. mobilis* adalah enzim glukosa fruktosa oksireduktase (GFOR). Enzim GFOR aktif pada pH antara 4,5 dan 7,5, dengan nilai pH optimum sebesar 6,2, yang mendekati pH intraselular 6,4-6,8. Temperatur optimum untuk produksi sorbitol adalah pada 39°C dan penonaktifan enzim GFOR terjadi pada temperatur di atas 42°C (Zachariou dan Scopes, 1986).

2.7 Kurva pertumbuhan bakteri

Suatu bakteri diambil sedikit kemudian ditanam dalam medium cair yang cocok, maka akan terjadi pertumbuhan sel. Akan tetapi tidak semua sel yang terbentuk akan terus hidup. Pertumbuhan bakteri tersebut mengikuti kurva pertumbuhan melalui beberapa fase (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 kurva pertumbuhan bakteri (Waluyo, 2007)

Mula-mula, suatu bakteri akan memasuki fase I yakni fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan substrat dan kondisi lingkungan. Pada fase ini, pembelahan sel belum terjadi karena beberapa enzim mungkin belum disintesis.

Jumlah sel pada fase ini tetap tetapi juga kadang-kadang menurun. Lamanya fase adaptasi bervariasi tergantung dari kecepatan penyesuaian bakteri dengan lingkungannya. Lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh medium dan lingkungan pertumbuhan serta jumlah inokulum.

Setelah mengalami fase adaptasi, sel mulai membelah dengan kecepatan rendah karena baru melewati tahap penyesuaian. Fase II ini disebut fase pertumbuhan awal atau fase permulaan biakan.

Setelah mikroba menyesuaikan diri dengan lingkungan, yakni melewati fase adaptasi dan fase pertumbuhan awal, maka sel akan membelah dengan cepat, dimana jumlah pertambahan sel mengikuti kurva logaritmik oleh karena itu fase III ini disebut fase pertumbuhan logaritmik. Kecepatan pertumbuhan sel sangat dipengaruhi oleh medianya seperti pH dan kandungan nutrisi, suhu dan kelembapan udara. Pada fase ini sel paling sensitif terhadap kondisi lingkungannya. Bila dikehendaki bakteri yang cepat tumbuh maka bakteri pada fase ini baik sekali untuk dijadikan inokulum.

Fase IV disebut fase pertumbuhan lambat. Perlambatan pertumbuhan sel dikarenakan oleh berkurangnya zat nutrisi dan juga mungkin terdapat zat hasil metabolisme yang beracun atau menghambat pertumbuhan bakteri. pertumbuhan sel tidak stabil pada fase ini, tetapi jumlah populasi masih naik. Hal ini karena jumlah sel yang masih tumbuh lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.

Fase pertumbuhan statis (Fase V) dimulai setelah fase pertumbuhan lambat dimana jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan nutrisi maka kemungkinan sel bakteri tersebut memiliki komposisi yang berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritma. Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrem seperti panas, dingin, radiasi dan bahan kimia.

Sebagian sel mulai mengalami kematian pada fase VI sehingga fase ini disebut fase menuju kematian. Kematian terjadi oleh beberapa sebab yakni nutrisi dalam medium sudah habis atau juga energi cadangan di dalam sel juga habis. Jumlah sel yang mati akan semakin banyak dan pertumbuhan bakteri mulai

memasuki fase kematian (fase VII). Kecepatan kematian dipengaruhi oleh kondisi nutrien, lingkungan dan bakteri itu sendiri (Waluyo, 2007).

2.8 Cara perhitungan jumlah dan massa sel

Pertumbuhan secara umum dapat didefinisikan sebagai penambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup. Perbanyakan sel adalah akibat dari pertumbuhan. Ada beberapa cara yang dapat digunakan untuk mengukur atau menghitung jumlah jasad renik, yaitu perhitungan massa sel dan perhitungan jumlah sel.

Perhitungan massa sel menggunakan turbidimetri atau gravimetri jarang digunakan dalam menguji jumlah mikroba pada bahan. Cara ini lebih sering digunakan untuk mengukur pertumbuhan sel selama proses fermentasi. Perhitungan massa sel mikroorganisme dengan cara turbidimetri dapat dilakukan jika medium pertumbuhannya tidak mengganggu pengukuran.

Perhitungan jumlah sel dapat dilakukan dengan metode Petroff-Hausser counting chamber dan metode hitungan cawan. Cara yang paling umum digunakan adalah metoda hitungan cawan. Prinsip dari metode hitungan cawan ialah bila sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium, maka mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop. Metode ini merupakan metode yang paling sensitif karena hanya sel mikroba yang hidup yang dapat dihitung. Beberapa jasad renik juga dapat dihitung sekaligus sehingga dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari mikroba yang mempunyai penampakan yang spesifik.

Selain keuntungan yang dimiliki, metode ini juga mempunyai beberapa kelemahan. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk koloni. Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan jumlah yang berbeda pula. Mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak, jelas dan tidak menyebar. Metode ini

memerlukan persiapan dan waktu inkubasi relatif lama hingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.

Penentuan jumlah bakteri pada sampel awal dilakukan dengan memilih cawan berisi koloni antara 30-300 koloni. Kurang dari 30 koloni termasuk tidak akurat, karena kontaminan tunggal menyebabkan kesalahan sekitar 4%. Cawan dengan koloni lebih besar dari 300 sulit untuk dihitung. Jumlah bakteri dalam sampel awal dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Colony Forming Unit (CFU) per ml} = \text{jumlah koloni} : (\text{pengenceran} \times \text{inokulasi})$$

Laporan dari hasil menghitung dengan cara hitungan cawan menggunakan suatu standar yang disebut Standard Plate Count (SPC). Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang memiliki koloni antara 30-300. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Dalam SPC ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut: (1) Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yakni angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal), jika angka ketiga sama dengan atau lebih besar daripada 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh, didapatkan $1,7 \times 10^4$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^6$ unit koloni/gram, (2) Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni per cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Karena itu, jumlah koloni pada pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung, (3) Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni per cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Karena itu, jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung, (4) Jika jumlah cawan dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara 30-300 dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan

memperhitungkan faktor pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih kecil dari dua, yang dilaporkan hanya hasil terkecil, (5) Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh dari salah satu saja (Waluyo, 2007).

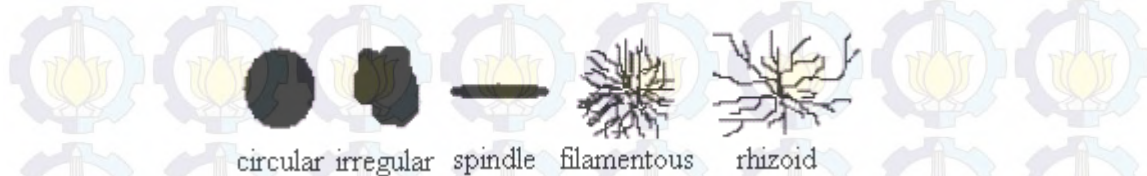
2.8 Identifikasi morfologi pada bakteri

Bentuk koloni berbeda-beda untuk tiap spesies dan bentuk itu menjadi ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Sifat-sifat yang perlu diperhatikan pada koloni yang tumbuh di permukaan medium antara lain: (1) besar kecilnya koloni: ada koloni yang hanya berupa suatu titik, ada yang melebar sampai menutup permukaan medium, (2) bentuk: ada koloni yang bulat dan ada yang memanjang, (3) Tepi koloni: ada yang tepinya rata dan ada yang tepinya tidak rata, (4) kenaikan permukaan: ada koloni yang rata saja dengan permukaan medium, ada yang timbul, yakni menjulang tebal di atas permukaan medium, (5) halus kasarnya permukaan: ada koloni yang permukaannya halus, ada yang permukaannya kasar dan tidak rata, (6) wajah permukaan: ada koloni yang permukaannya mengkilat dan ada yang permukaannya suram, (7) warna: kebanyakan koloni bakteri berwarna keputihan atau kekuning-kuningan, tetapi ada juga koloni yang kemerah-merahan, coklat, jingga, biru, hijau, ungu, (8) kepekatan: ada koloni yang lunak seperti lendir, ada yang lunak seperti mentega, ada yang keras dan kering.

Ada juga sifat-sifat khusus suatu koloni dalam medium padat berupa agar-agar lempengan pada cawan petri, pada agar-agar miring dan pada tusukan gelatin. Pengamatan penampakan bakteri pada cawan petri dilakukan dengan cara menumbuhkan kultur murni hasil isolasi dengan metode pengenceran, bisa digunakan teknik cawan gores, cawan tuang maupun cawan sebar. Hasil koloni yang tumbuh akan mempunyai penampakan yang khusus dalam hal ukuran (Gambar 2.6), bentuk koloni (Gambar 2.7), tepi koloni (Gambar 2.8) dan tingkat *elevasi* atau kenaikan permukaan koloni (Gambar 2.9).



Gambar 2.6 Sifat koloni berdasarkan ukurannya (Waluyo, 2007)



Gambar 2.7 Sifat koloni berdasarkan bentuk koloni dari atas (Waluyo, 2007)

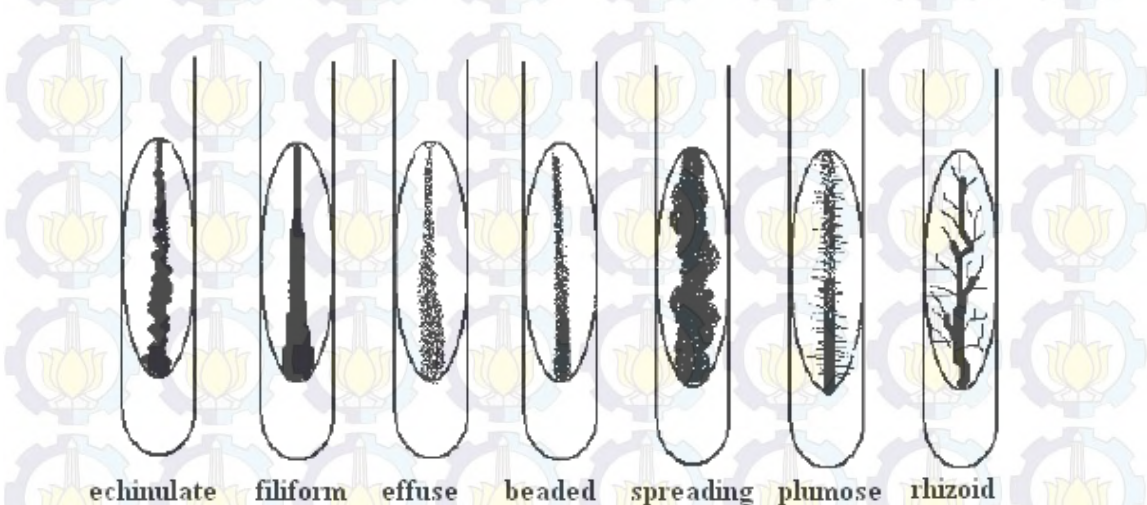


Gambar 2.8 Sifat koloni berdasarkan bentuk tepi koloni (Waluyo, 2007)



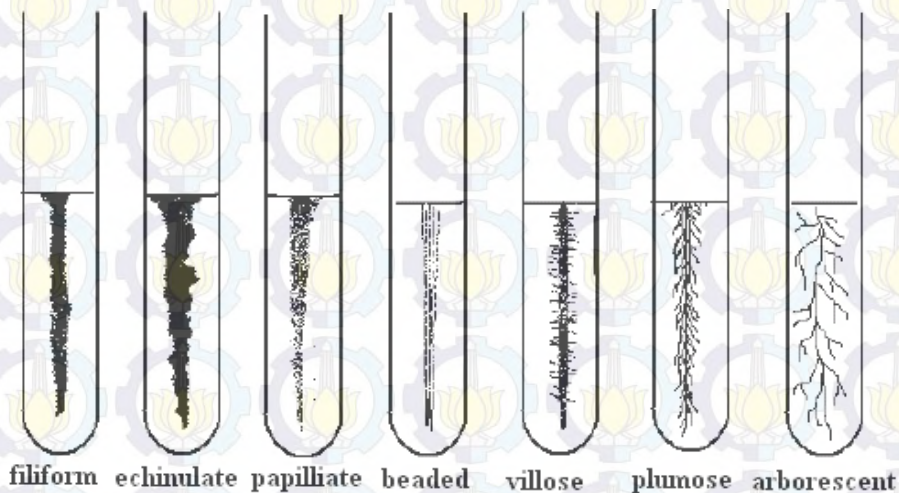
Gambar 2.9 Sifat koloni berdasarkan kenaikan permukaan koloni (Waluyo, 2007)

Sifat-sifat koloni pada agar-agar miring berkisar pada bentuk dan tepi koloni. Ciri-ciri koloni diperoleh dengan menggoreskan jarum inokulum tegak dan lurus. Bentuk-bentuk koloni akan terlihat seperti pada Gambar 2.10.



Gambar 2.10 bentuk koloni pada agar-agar miring (Waluyo, 2007)

Ada bakteri yang mengencerkan gelatin dan ada yang tidak mampu mengencerkan gelatin. Oleh karena itu, bentuk koloninya juga berbeda-beda. Cara penanaman adalah dengan menusukkan jarum inokulasi berujung tajam ke dalam media gelatin tegak. Bila dilihat dari samping, bentuk-bentuk koloni yang tidak mengencerkan gelatin dapat dilihat pada Gambar 2.11 (Waluyo, 2007).



Gambar 2.11 Bentuk koloni pada tusukan gelatin, gelatin tidak termakan (Waluyo, 2007)

2.9 Isolasi bakteri menggunakan teknik pengenceran

Mikroorganisme di alam banyak ditemukan tumbuh dalam lingkungan yang mengandung organisme yang berbeda. Akan tetapi, kultur campuran sangat sedikit digunakan dalam mempelajari organisme karena kesulitan yang dihadirkan dalam menentukan organisme mana yang bertanggungjawab atas aktivitas yang diamati. Kultur murni, yang mengandung satu jenis mikroba, diperlukan untuk mempelajari karakteristik pertumbuhan dan metabolismenya. Bakteri terlalu kecil untuk dipisahkan secara langsung tanpa peralatan mikromanipulasi yang canggih maka harus digunakan metode pemisahan secara tidak langsung.

Pada saat ini, ada tiga metode pengenceran yang biasa digunakan untuk isolasi bakteri yakni cawan gores, cawan sebar dan cawan tuang. Dalam teknik cawan gores, jarum ose digunakan untuk menggores sampel campuran berkali-kali pada permukaan medium kultur padat dalam cawan petri. Secara teoritis, proses penggoresan jarum ose akan membuat bakteri jatuh satu persatu dan

akhirnya akan terdistribusi pada seluruh permukaan agar, dimana tiap sel akan berkembang menjadi sebuah koloni. Cawan gores adalah teknik isolasi yang paling umum digunakan saat ini. Pola penggoresan mikroba di cawan petri berisi medium agar ditunjukkan pada Gambar 2.12.



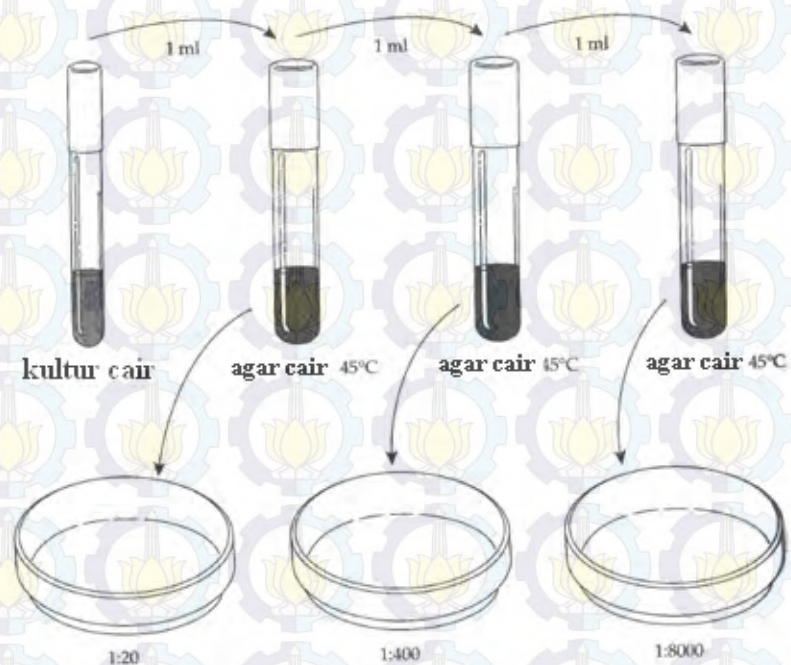
Gambar 2.12 Teknik cawan gores (Johnson dan Case, 2004)



Gambar 2.13 Teknik inokulasi pada cawan sebar menggunakan stik perata (Johnson dan Case, 2004)

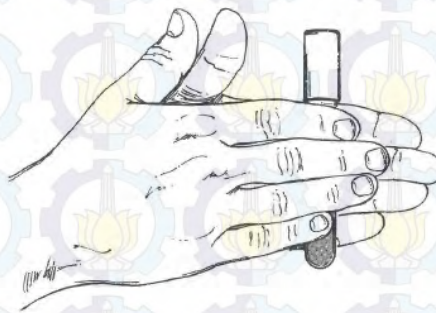
Cawan sebar dan cawan tuang adalah teknik kuantitatif yang membuat seseorang dapat menentukan jumlah bakteri dalam sampel. Teknik cawan sebar merupakan teknik dimana sejumlah kecil spesimen yang telah diencerkan

sebelumnya, disebar ke seluruh permukaan medium padat menggunakan batang gelas perata berbentuk L (Gambar 2.13).



Gambar 2.14 teknik cawan tuang. (Johnson dan Case, 2004)

Gambar 2.14 menunjukkan teknik cawan tuang, sejumlah kecil sampel yang telah diencerkan dicampur dengan agar steril yang telah dilelehkan dan dituang ke dalam cawan petri kosong yang telah disterilkan. Cara penghomogenan bakteri dalam media agar yang masih cair dapat dilihat pada Gambar 2.15. Setelah inkubasi, pertumbuhan bakteri akan tampak sebagai koloni di dalam dan di atas agar dari cawan tuang (Waluyo, 2007).



Gambar 2.15 Teknik mencampur koloni metode cawan tuang (Johnson dan Case, 2004).

2.8 Analisis gula menggunakan kromatografi gas spektroskopi massa

Sebenarnya kromatografi gas bukan merupakan alat yang ideal untuk mengidentifikasi zat yang sama sekali tidak diketahui. Untuk itu diperlukan cara lain sebagai tambahan, seperti spektroskopi infra-merah dan spektroskopi massa. Kromatografi gas cairan merupakan alat yang sangat baik untuk pemisahan dan kuantifikasi komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Agar hasilnya baik berbagai standarisasi harus dilakukan sebelum pengambilan data dilakukan. Senyawa standard harus murni. Senyawa standard tersebut harus dianalisis untuk menentukan kelurusan respon dan detektor. Selain itu harus ditentukan faktor koreksi untuk masing-masing kolom yang digunakan dan masing-masing zat yang dianalisis.

Respon detektor (RD) perlu ditentukan agar hubungan antara banyaknya sampel yang diinjeksikan dengan respon detektor dapat diketahui. Besarnya respon detektor dipengaruhi oleh tipe detektor, jenis kolom, merek kromatograf, dan jenis senyawa yang diselidiki.

$$RD = \frac{\text{Luas Puncak}}{\text{Berat sampel}}$$

Untuk mendapatkan faktor koreksi dipilih RD senyawa standard misalnya 352 unit luas per μg . Besarnya faktor koreksi suatu senyawa ialah RD senyawa tersebut dibagi 352.

$$F = \frac{RD \text{ senyawa}}{RD \text{ senyawa standard}}$$

Untuk menghitung secara kuantitatif berat senyawa yang akan ditentukan, luas puncak kromatogram harus dikoreksi dengan mengalikan luas puncak sesungguhnya dengan faktor koreksi F.

Analisis karbohidrat dengan kromatografi gas cair terutama untuk mengetahui jenis gula sederhana yang menyusun suatu karbohidrat. Polisakarida harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula sederhana. Gula-gula sederhana tersebut harus diubah menjadi senyawa eter derivat TMS. Meskipun proses pembuatan derivat TMS tidak sukar, namun memerlukan kecermatan. Untuk dapat dianalisis menggunakan kromatografi gas cair senyawa yang bermolekul

besar yang mengandung gugus hidroksil seperti sterol dan tokoferol, umumnya diubah dahulu menjadi derivate TMS (Adnan, 1997).

BAB III METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya pada bulan September 2011 sampai dengan Januari 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petri, beker gelas, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, jarum ose, lampu spirtus, pipet mikro, pipet tetes, corong, spatula, neraca analitik (Metler AE 200), slide mikroskop, mikroskop (Olympus, CX21FSI, Jepang), *shaking incubator* (Thermoshake, Gerhardt), *autoclave* (High Pressure Steam Sterilizer ES-315), sentrifuge (Ogawa Seiki Co.,Ltd.), Spektrofotometer (spektronik 20), pemanas (Thermolyne), kertas indikator pH universal dan seperangkat alat kromatografi gas (HP).

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Zymomonas mobilis* jepang yang diperoleh dari laboratorium Biokimia FMIPA ITS, Surabaya, Media nutrient agar (NA), glukosa, sukrosa, yeast ekstrak, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, larutan NaOH, larutan H_2SO_4 , aquabides, aquademineralisasi, reagen DNS, metanol, piridin, BSTFA, *methylen blue*, minyak imersi, kristal violet, larutan iodin, etil alkohol, safranin, *thioglycollate*, agar dan media semi padat *Sulfide Indol Motility* (SIM), glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol, *phenol red broth*, *MRVP broth* dan malakit hijau (*green malachite*).

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pembuatan media regenerasi *Zymomonas mobilis*

Nutrien agar (NA) ditimbang sebanyak 2,8 gram dan dilarutkan dalam 100 ml aquades dengan cara dipanaskan hingga larut sempurna. Larutan NA kemudian dimasukkan ke dalam tiap tabung reaksi sebanyak 5 ml kemudian tabung reaksi ditutup dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa. Tabung reaksi yang telah berisi medium kemudian diletakkan dalam beker glas dan diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Segera setelah selesai diautoklaf, tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring. Media agar miring dibiarkan selama 24 jam dan apabila bebas dari kontaminasi maka media siap digunakan untuk regenerasi *Zymomonas mobilis*.

3.3.2 Identifikasi morfologi *Zymomonas mobilis*

3.3.2.1 Uji kemurnian kultur *Zymomonas mobilis* pada media agar miring dengan pengamatan secara mikroskopik

Satu koloni isolat bakteri diambil secara aseptis dengan jarum ose dan diinokulasikan ke permukaan media padat NA-HgCl₂ 10 ppm dengan metode 16 goresan dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Satu koloni yang tumbuh kemudian diambil dan dipindahkan lagi ke media baru NA-HgCl₂ 10 ppm dengan metode 16 goresan. Pemindahan koloni isolat dilakukan sebanyak 5 kali tahapan.

Untuk mengetahui apakah dalam 3 kali pemindahan telah didapatkan isolat murni, maka dilakukan pengamatan bentuk sel secara mikroskopis. Isolat murni adalah isolat yang hanya terdiri dari satu spesies (Irianto, 2007). Sehingga apabila dari pengamatan mikroskopik terlihat bahwa dalam 1 koloni hanya terdiri satu bentuk sel yang sama, maka pemurnian telah menghasilkan isolat murni.

Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan sederhana. Satu tetes akuades ditetaskan ke ujung tengah kaca obyek. Satu ose bakteri kemudian goreskan ke tetesan tersebut dan ditarik memanjang pada kaca objek membentuk pola zig-zag sampai ujung berlawanan. Preparat kemudian difiksasi dengan melewati di atas api bunsen sampai akuades kering. Penyediaan preparat yang mengikuti langkah-langkah tersebut di atas selanjutnya disebut sebagai preparat

ulas. Preparat ulas selanjutnya diwarnai dengan *methylen blue* (Merck, Jerman) dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan sel bakteri dilakukan dibawah mikroskop (Olympus, CX21FSI, Jepang) pada perbesaran 1000X dengan bantuan satu tetes minyak imersi (Olympus, Jepang) yang ditetaskan pada permukaan atas luar gelas penutup.

3.3.2.2 Identifikasi morfologi *Zymomonas mobilis* secara makroskopik

Pengamatan makroskopik dan mikroskopik merupakan salah satu langkah karakterisasi isolat bakteri, selain dengan uji biokimia. Pengamatan mikroskopik adalah untuk mengetahui bentuk sel isolat bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan sederhana seperti yang telah disebutkan di atas (3.3.2.1) Sedangkan pengamatan makroskopik adalah pengamatan bentuk pertumbuhan koloni yang bakteri yang tumbuh di permukaan media padat NA-HgCl₂ 10 ppm. Parameter karakter koloni meliputi :

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumparan.
- b. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
- c. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni: keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening (Dwijoseputro, 2003).

3.3.2.3 Uji aspek biokimia *Zymomonas mobilis*

Uji biokimia yang dilakukan merupakan hasil modifikasi metode dari dari Lay (1994), Cappucino dan Sherman (2001), Harley dan Prescott (2002), dan Collins and Lyne (1985). Uji biokimia terdiri dari pewarnaan Gram dan endospora, kebutuhan oksigen, fermentasi karbohidrat, IMVP (Indol-Metyl Red-Voges Proskauer) dan uji degradasi protein (pembentukan hidrogen sulfida, oksidase dan katalase). Sebelum melakukan pengujian, isolat bakteri sebelumnya diremajakan dalam media padat NA-HgCl₂ 10 ppm hingga diperoleh isolat yang berumur 24 jam.

3.3.2.3.1 Pewarnaan Gram

Preparat ulas ditetesi larutan kristal violet sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 20 detik, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya larutan iodine (Merck, Jerman) ditetaskan sebanyak 2-3 tetes di atas permukaan preparat dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikering anginkan. Larutan *etil alkohol* (Merck, Jerman) 95% ditetaskan setetes demi setetes di atas permukaan lapisan preparat sampai kristal violet tercuci dan kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan safranin ditetaskan di atas permukaan kaca obyek dan didiamkan selama 20 detik, dicuci di bawah air mengalir dan dibiarkan kering di udara. Setelah preparat ditutup dengan gelap penutup, kemudian diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 1000X dengan bantuan minyak imersi (Lay, 1994).

3.3.2.3.2 Pewarnaan Endospora

Preparat ulas ditempatkan pada rak pewarnaan. Preparat ulas ditutup penuh dengan kertas saring. Kemudian zat warna malakit hijau (*green malachite*) ditetaskan dengan pipet Pasteur ke permukaan kertas saring secara merata dan selanjutnya dipanaskan selama 5 menit dan didinginkan. Setelah preparat dingin, kertas saring dibuang dan preparat dibilas dengan air yang mengalir dan dibiarkan kering di udara. Kemudian preparat diwarnai dengan safranin selama 1 menit dan dibilas dengan air yang mengalir dan dibiarkan kering di udara. Setelah ditutup dengan gelas penutup, preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X dengan minyak imersi (Lay, 1994).

3.3.2.3.3 Kebutuhan Oksigen

Sebanyak 3 gram agar dan 29.5 gram media *thioglycollate* (Oxoid, CMO173, Inggris) dilarutkan ke dalam 1 liter akuades dan dipanaskan diatas pemanas (Gerhard, EVI, Jerman) sampai agar larut dan homogen. Kemudian media didistribusikan ke dalam tabung reaksi sebanyak sebanyak 7 ml dan disterilisasi dalam autoklaf (Hirayama, HL 42A, Jepang) pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, tabung reaksi yang berisi media langsung dimasukkan ke dalam bak yang berisi air yang telah

diatur suhunya setinggi 50°C untuk mencegah pemadatan agar. Setelah suhu media teradaptasi pada suhu 50°C yang ditandai dengan media terasa hangat-hangat kuku, kemudian satu ose isolat bakteri berumur 24 jam di inokulasikan ke dalam media tersebut secara aseptis. Tabung reaksi kemudian diputar dengan telapak tangan, agar bakteri terdistribusi merata di dalam agar. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C pola pertumbuhan isolat bakteri diamati. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh di permukaan media, maka isolat tersebut adalah aerob obligat. Apabila isolat bakteri tumbuh sepanjang kolom tabung reaksi, tetapi pertumbuhan terpekat pada permukaan agar, maka isolat adalah anaerob fakultatif. Apabila isolat bakteri tumbuh merata sepanjang kolom tabung reaksi, maka isolat adalah anaerob aerotoleran. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh dibawah permukaan agar, tetapi tidak sampai sepanjang kolom tabung reaksi, maka isolat adalah mikroaeroflik. Sedangkan apabila hanya tumbuh pada dasar tabung reaksi, maka isolat adalah anaerob obligat (Harley dan Prescott, 2002, Cappuccino dan Sherman, 2001).

3.3.2.3.4 Fermentasi Karbohidrat

Karbohidrat yang digunakan adalah glukosa, laktosa dan manitol. Media fermentasi adalah 1% glukosa (Difco, USA), 0.5% laktosa (Difco, USA) dan 0.5% manitol (Difco, USA) yang masing-masing dilarutkan ke dalam media cair *phenol red broth*. Selanjutnya media fermentasi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham sebanyak 3 ml. Satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media fermentasi tersebut secara aseptis dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C (Noviani, 2002; Collins and Lyne, 1985). Fermentasi akan mengubah karbohidrat menjadi alkohol, asam organik dan beberapa bakteri juga menghasilkan gas CO₂. Tes positif ditandai dengan terbentuk warna kuning sebagai indikator bahwa pH media menjadi asam karena terlarutnya senyawa asam organik dalam media tersebut. Sedangkan tes negatif ditandai dengan warna merah. Pembentukan gas CO₂ diamati dari adanya gas dalam tabung Durham.

3.3.2.3.5 Uji Katalase

Satu ose isolat bakteri digoreskan secara aseptis ke kaca objek dan kemudian pada permukaannya ditetesi sebanyak satu tetes H_2O_2 3%. Hasil positif ditandai dengan timbulnya gas atau gelembung udara di sekitar goresan bakteri tersebut (Harley dan Prescott, 2002).

3.3.2.3.6 Uji Pembentukan Hidrogen Sulfida (H_2S)

Jarum inokulasi yang ujung tajamnya mengandung isolat bakteri ditusukkan ke dalam media semi padat *Sulfide Indol Motility* (SIM) (Difco, USA) secara aseptis dan diinkubasikan selama 24 jam pada temperatur 37°C (Cappuccino & Sherman, 2001). Tes positif ditandai dengan terbentuknya endapan hitam di dalam media sebagai indikator terbentuknya H_2S . Hasil tes ini juga digunakan untuk tes motilitas. Apabila bakteri tersebut motil maka dari permukaan media, pertumbuhan bakteri terlihat melebar dan menyempit ke arah dasar tabung reaksi mengikuti arah tusukan jarum. Apabila bakteri non motil, pertumbuhan bakteri hanya terlihat pada daerah tusukan jarum saja.

3.3.2.3.7 Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan mengoleskan biakan bakteri umur 24 jam ke permukaan kertas oksidase (Oxoid, Inggris) secara aseptis dengan tusuk gigi steril. Apabila hasil positif, maka setelah 5 detik terbentuklah warna ungu pada kertas oksidase tersebut (Harley dan Prescott, 2002).

3.3.2.3.8 Uji Pembentukan Indol

Satu ose isolat bakteri diinokulasikan secara aseptis ke 3 ml media cair *Trptic Soy Broth* (TSB) (Difco, USA) dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dan setelahnya ditambahkan 0,5 ml *Kovac's reagent* (Merck, Jerman) (Cappuccino & Sherman, 2001). Tes positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah.

3.3.2.3.9 Uji Metil Merah

Satu ose biakan bakteri diinokulasikan secara aseptis pada 3 ml media cair *Methyl Red Voges-Proskauer broth* (MR-VP)(Difco, USA) di tabung reaksi dan diinkubasikan pada suhu 37⁰ C selama 120 jam. Setelah itu ditambahkan 2 tetes indikator *Methyl Red* (Cahaya Kimia, Surabaya). Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah pada media (Cappuccino & Sherman, 2001).

3.3.2.3.10 Uji Voges Proskauer

Satu jarum ose biakan bakteri diinokulasikan secara aseptis pada 3 ml media cair *MR-VP broth*, lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 120 jam (5 hari). Setelah itu ditetesi KOH 40% (Merck, Jerman) sebanyak 5 tetes dan 10 tetes α -*naftol* 5% (Merck, Jerman). Apabila hasil positif maka setelah 15 menit media berubah warna menjadi merah (Cappuccino & Sherman, 2001).

3.3.3 Penentuan efek aerasi pada pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

Satu ose *Zymomonas mobilis* diinokulasikan ke dalam 200 mL medium yang terdiri atas 100 g/l glukosa, 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l MgSO₄.7H₂O, 1 g/l KH₂PO₄ dan 5 g/l yeast ekstrak lalu medium ini dibagi ke dalam dua Erlenmeyer 250 mL masing-masing berisi 100 mL medium dan diinkubasi dengan perlakuan yang berbeda. Media I diinkubasi pada kondisi fermentasi temperatur 30°C dan dishaker pada kecepatan 120 rpm sedangkan media II diinkubasi pada temperatur yang sama hanya saja tidak di shaker. Media kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer tiap jam pada λ 500 nm hingga fasa kematian terjadi. Blanko yang digunakan adalah medium fermentasi steril yang tidak diinokulasi dengan *Zymomonas mobilis*.

3.3.4 Penentuan konsentrasi optimum sukrosa

Satu ose *Zymomonas mobilis* diinokulasikan ke dalam 10 ml media inokulum dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm. Inokulum kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml medium sukrosa yang terdiri atas 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l MgSO₄.7H₂O, 1 g/l KH₂PO₄, 5 g/l yeast ekstrak dan sukrosa 200, 250, dan 300 g/l. Masing-masing

medium sukrosa lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 24 jam, medium inokulum masing-masing konsentrasi kemudian dipindah ke dalam medium sukrosa 90 ml. Masing-masing medium kemudian diinkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm. Tiap Medium hasil fermentasi disentrifuge dan supernatannya diambil sebanyak 50 ml. Supernatan di destilasi menggunakan kolom vigreux dan destilat dianalisis menggunakan peralatan kromatografi gas.

3.3.5 Pembuatan inokulum *Zymomonas mobilis*

Media inokulum terdiri atas 100 g/l glukosa, 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l MgSO₄.7H₂O, 1 g/l KH₂PO₄ dan 5 g/l yeast ekstrak (Liu dkk, 2010). Masing-masing bahan ditimbang kemudian dilarutkan dan ditempatkan pada wadah yang terpisah lalu di cek pHnya menggunakan kertas indikator pH dan medium di atur pHnya sehingga menjadi pH 6 menggunakan NaOH dan H₂SO₄. Setelah semua bahan telah sesuai pHnya, wadah disumbat dengan kapas berlemak yang terbungkus kain kasa lalu diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Semua bahan dicampur secara aseptis dalam laminary flow. Satu ose sel *Zymomonas mobilis* dari media agar miring diinokulasikan ke dalam 10 mL media cair dan diinkubasi selama 24 jam. Inokulum diinokulasikan dalam medium cair baru dengan konsentrasi 10% sebanyak 100 ml dan diinkubasi selama 24 jam. Inokulum dibagi menjadi dua masing-masing sebanyak 50 ml dan diinokulasikan ke dalam medium cair baru dengan konsentrasi 10% sebanyak 500 ml dan diinkubasi selama 24 jam. Inokulum kemudian dipanen dan disentrifuse untuk diambil biomasnya. Dua inokulum ini nantinya dipergunakan dalam proses fermentasi produksi sorbitol dengan dan tanpa penambahan kation logam Zn²⁺.

3.3.6 Proses fermentasi produksi sorbitol dengan dan tanpa penambahan kation logam Zn²⁺

Inokulum kemudian dimasukkan dalam 500 ml medium yang terbuat dari 300 g/l sukrosa, 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l MgSO₄.7H₂O, 1 g/l KH₂PO₄ dan 5 g/l yeast ekstrak. Medium diinkubasi dengan kondisi fermentasi pada pH 6, temperatur 39°C dan dishaker dengan kecepatan 120 rpm. Ini merupakan

fermentasi tanpa penambahan kation logam Zn^{2+} , sedangkan untuk fermentasi dengan penambahan kation logam Zn^{2+} tinggal menambahkan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sebanyak 1,0 g/l dalam pembuatan medium fermentasi sedangkan perlakuan lainnya sama halnya dengan fermentasi tanpa penambahan kation logam.

3.3.7 Metode Analisa

3.3.7.1 Analisa Kadar Gula Reduksi

3.3.7.1.1 Pembuatan kurva kalibrasi standard glukosa

Pertama larutan dinitrosalisilat (DNS) 1% dibuat dengan melarutkan 10 gram asam 2,4-dinitrosalisilat, 2 gram fenol, 0,5 gram natrium sulfit, 10 gram natrium hidroksida, ke dalam 1 liter aquades. Larutan kemudian disimpan dalam wadah berwarna gelap dan dihindarkan dari cahaya. Sedangkan larutan garam Rochelle merupakan larutan kalium natrium tartrat 40%.

Larutan standard glukosa dibuat dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Selanjutnya 3 ml dari masing-masing larutan diletakkan dalam lima tabung reaksi dan disiapkan pula satu tabung reaksi berisi 3 ml aquades sebagai blanko. Selanjutnya tiap 3 ml larutan tersebut ditambah 3 ml reagen DNS dan ditutup menggunakan aluminium foil. Larutan tersebut kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 10-15 menit. Larutan diambil dan ditambah 1 ml larutan garam Rochelle untuk menstabilkan warna. Selanjutnya larutan didinginkan pada air kran yang mengalir hingga sesuai dengan suhu ruang. Setelah itu larutan siap diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 575 nm. Hasil yang didapat kemudian dibuat sebagai kurva standard glukosa sebagai gula tereduksi versus absorbansi (Miller, 1959).

3.3.7.1.2 Penentuan kadar gula reduksi hasil fermentasi (untuk perlakuan nomor 3.3.6)

Pertama larutan sampling hasil fermentasi disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan kemudian dipisahkan dan diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan menjadi 100 ml. Penentuan kadar gula reduksi medium supernatan hasil fermentasi sama dengan perlakuan glukosa standard.

Setelah diperoleh nilai absorbansi maka nilai konsentrasi glukosa sebagai gula tereduksi dapat dicari berdasarkan kurva kalibrasi.

3.3.7.2 Analisa konsentrasi biomassa dengan metoda turbidimetri (untuk perlakuan nomor 3.3.6)

Pada analisa konsentrasi biomassa menggunakan metoda turbidimetri, Optical Density (OD) berbanding lurus dengan jumlah sel. Pada penentuan pertumbuhan sel menggunakan metoda turbidimetri, kekeruhan biakan bakteri dikorelasikan dengan penentuan jumlah mikroba dengan metoda cawan tuang. Dalam penelitian ini pengukuran kekeruhan dilakukan pada panjang gelombang 500 nm (hasil optimasi panjang gelombang) dengan menggunakan spektronik 20 D.

3.3.7.3 Analisa konsentrasi biomassa dengan metoda cawan tuang (untuk perlakuan nomor 3.3.6)

Konsentrasi biomassa juga dapat dilihat berdasarkan jumlah koloni yang terbentuk setelah medium biakan diencerkan hingga koloni yang dapat dihitung antara 30-300 *Colony Forming Unit* (CFU). Biakan yang telah diencerkan tersebut kemudian dituang sebanyak 10 µl menggunakan mikro pipet ke dalam cawan petri yang telah berisi media NA. Biakan tersebut kemudian di ratakan menggunakan stik perata berbentuk L dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang baru kemudian dihitung jumlah koloni yang ada dan dikorelasikan terhadap nilai absorbansi dan waktu fermentasi.

3.3.7.4 Analisa kualitatif etanol (untuk perlakuan nomor 3.3.6)

Untuk mendeteksi adanya alkohol dalam hasil fermentasi. Medium hasil sampling fermentasi kemudian di sentrifus pada 1500 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian diambil sebanyak 1 ml kemudian ditempatkan dalam tabung reaksi. Kertas saring yang telah dibasahi dengan setetes H_2SO_4 ditambah dengan setetes $K_2Cr_2O_7$ diletakkan pada leher tabung tes kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Keberadaan alkohol diindikasikan dengan perubahan warna oranye menjadi hijau (Jungreis, 1926).

3.3.7.5 Analisa kuantitatif etanol (untuk perlakuan nomor 3.3.6)

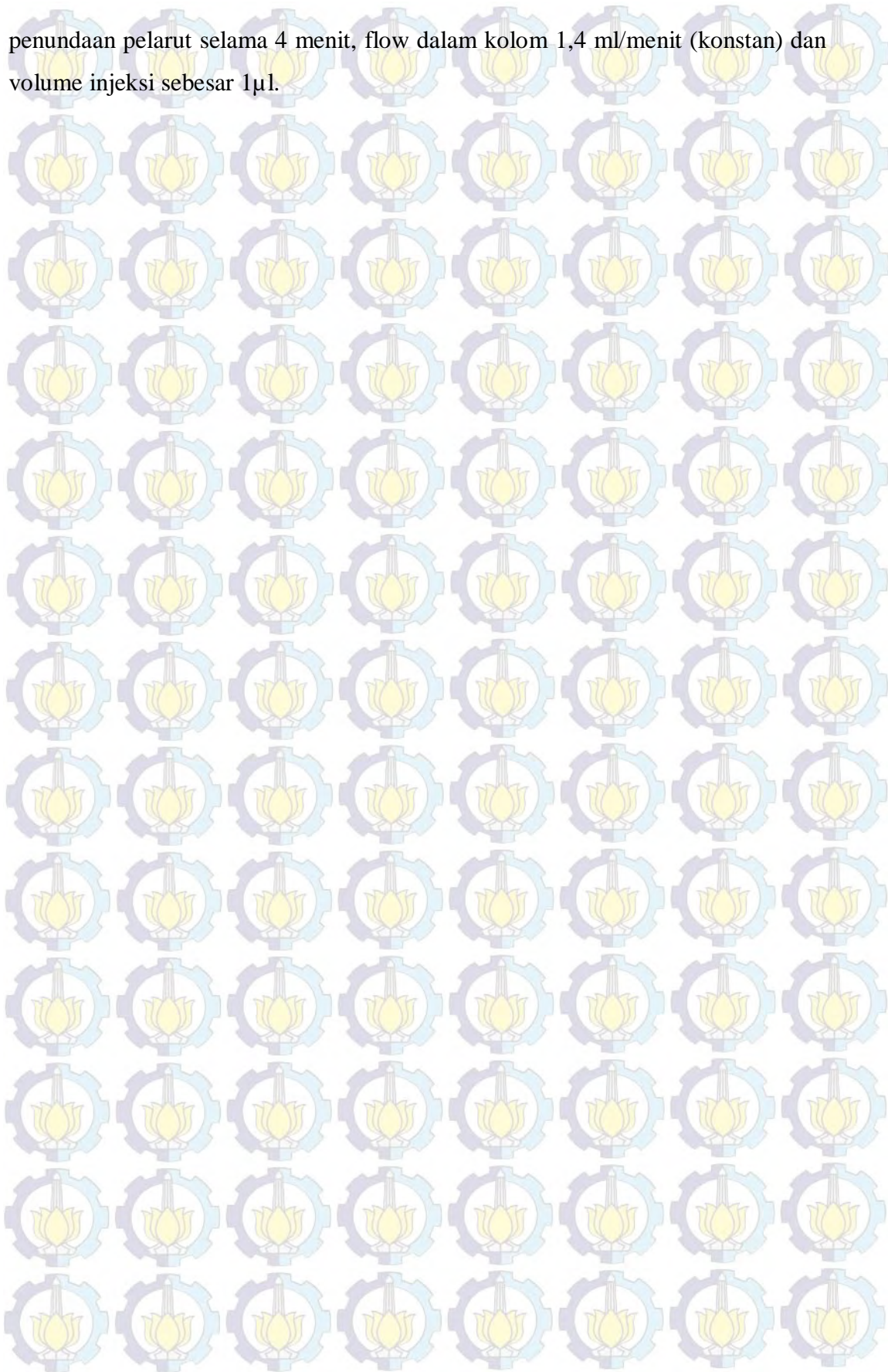
Kadar etanol dalam supernatan dianalisis dengan menggunakan peralatan kromatografi gas. Sampel cairan fermentasi disentrifus pada 1500 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian diambil sebanyak 50 ml dan didestilasi pada suhu 78-80°C menggunakan peralatan destilasi dengan kolom vigreux. Kadar etanol dalam distilat dianalisis dengan kromatografi gas HP 6890 series, kolom agilent 19095 P-Q04 HP plot Q, panjang kolom 30 m, detektor Front Detektor (FID), temperatur detektor 275°C, temperatur oven 150°C, temperatur kolom 280°C, gas pembawa helium dengan tekanan 16,24 psi dan waktu retensi untuk etanol 1,707 menit.

3.3.7.6 Analisa kadar sorbitol (untuk perlakuan nomor 3.3.6)

Larutan sampling hasil fermentasi disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan diambil dan dihomogenkan dengan cara dikocok. Sampel diambil sebanyak 2 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Sampel ditambah 2 ml methanol p.a lalu divortex selama 2 menit dan disentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 5500 rpm. Supernatan diambil sebanyak 400 µl (setara dengan 200 µl sampel) dan dimasukkan dalam vial GC. Sampel dikeringkan selama 2x 24 jam di dalam oven dengan suhu 60°C. Setelah kering, sampel ditambah 300 µl piridin p.a lalu ditutup rapat dan diultrasound selama 1 jam hingga sampel kering terlarut dalam piridin. Reagen BSTFA ditambahkan sebanyak 200 µl lalu vial kembali ditutup rapat. Botol vial berisi sampel tersebut lalu dipanaskan dalam penangas air bersuhu 90°C selama 1 jam untuk derivatisasi. Sampel lalu didiamkan pada suhu kamar lalu disentrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 5500 rpm. Sampel siap dianalisis dengan GC MS. Senyawa baku pembanding sorbitol 100 ppm sebanyak 200 µl diperlakukan sama dengan sampel.

Kondisi Peralatan GC-MS (agilent 6980 N Network GC system dengan autosampler) menggunakan detektor Agilent 5973 inert MSD, kolom J&W Scientific, HP-5,5% fenilmetilsiloksan panjang 30 m, diameter dalam 0,32 mm, ketebalan film 0,25 µm, inlet splitless 280°C, oven terprogram: 110°C (4 menit) setelah itu 2°C/menit pada suhu 100°C dan 5°C/menit hingga suhu 290°C,

penundaan pelarut selama 4 menit, flow dalam kolom 1,4 ml/menit (konstan) dan volume injeksi sebesar 1 μ l.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi morfologi *Zymomonas mobilis* galur liar

4.1.1 Uji kemurnian kultur *Zymomonas mobilis* pada media agar miring dengan pengamatan secara mikroskopik

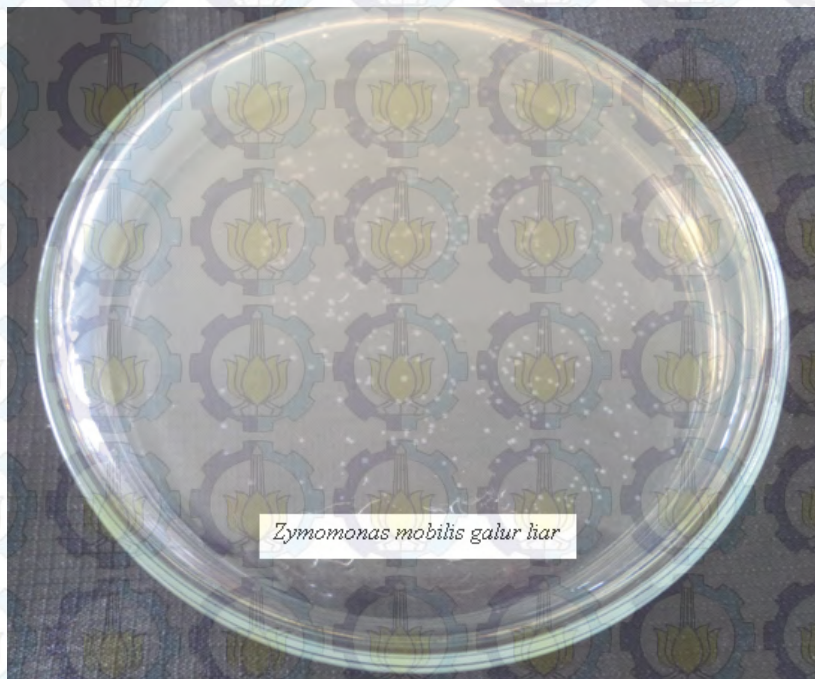
Mikroorganisme di alam banyak ditemukan tumbuh dalam lingkungan yang mengandung organisme yang berbeda. Akan tetapi, kultur campuran sangat sedikit digunakan dalam mempelajari organisme karena kesulitan yang dihadirkan dalam menentukan organisme mana yang bertanggungjawab atas aktivitas yang diamati. Kultur murni, yang mengandung satu jenis mikroba, diperlukan untuk mempelajari karakteristik pertumbuhan dan metabolismenya (Waluyo, 2007). Penelitian ini menggunakan stok kultur *Zymomonas mobilis* galur liar Jepang yang telah diteliti profil pembentukan etanolnya akan tetapi profil fermentasi sorbitolnya belum diteliti. Stok kultur ditumbuhkan ulang dan dimurnikan menggunakan teknik cawan gores 16 goresan (Gambar 4.1) sebanyak lima kali tahap pemindahan hingga diperoleh kultur murni. Kontrol dilakukan dengan pewarnaan gram. Kultur murni tersebut kemudian diidentifikasi lebih lanjut lewat uji morfologi dan biokimia.



Gambar 4.1 Teknik cawan gores 16 goresan

4.1.2 Identifikasi morfologi *Zymomonas mobilis* secara makroskopis

Bentuk koloni berbeda-beda untuk tiap spesies dan bentuk itu menjadi ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Sifat-sifat yang perlu diperhatikan pada morfologi koloni yang tumbuh di permukaan medium antara lain ukuran koloni, bentuk, tepi koloni, kenaikan permukaan, halus kasarnya permukaan, wajah permukaan, warna dan kepekatan. Aspek morfologi pada media cawan petri maupun pada agar miring dapat diamati secara makroskopis. Bentuk koloni *Z. mobilis* galur liar jepang berbentuk koloni kecil, bulat (circular) dengan tepi utuh (regular), kenaikan permukaannya berbentuk *convex*, halus, mengkilat, berwarna putih dan lunak (Gambar 4.2). Pertumbuhan *Z. mobilis* pada media agar miring ada yang berbentuk *filiform* atau *beaded*. Pertumbuhan *Z. mobilis* pada media agar miring lebih mengarah pada bentuk *filiform*.



Gambar 4.2 Bentuk koloni

4.1.3 Uji aspek biokimia *Zymomonas mobilis* galur liar

Uji biokimia terdiri dari pewarnaan Gram dan endospora, kebutuhan oksigen, fermentasi karbohidrat, IMVP (Indol-Metyl Red-Voges Proskauer) dan

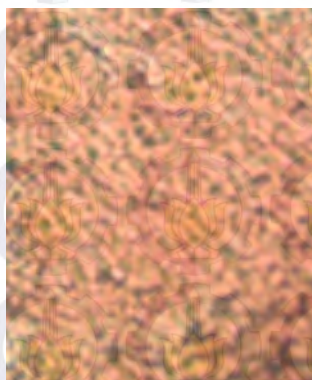
uji degradasi protein (pembentukan hidrogen sulfida, oksidase dan katalase). Sebelum melakukan pengujian, isolat bakteri sebelumnya diremajakan dalam media padat NA-HgCl₂ 10 ppm hingga diperoleh isolat yang berumur 24 jam.

Hasil pewarnaan gram *Z. mobilis* galur liar jepang sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis* yakni gram negatif (Gambar 4.3). Bentuk dan ukuran sel *Z. mobilis* merupakan ciri yang mencolok dikarenakan lebar sel yang tidak biasa pada bakteri yakni antara panjang dan lebarnya perbandingannya tidak terlalu jauh dan ketika umur kultur lebih tua maka bentuknya akan lebih panjang.



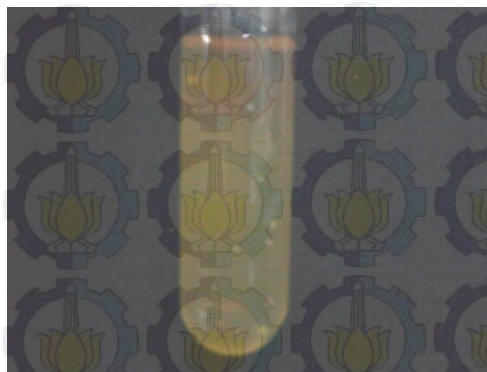
Gambar 4.3 kultur 24 jam perbesaran 500x

Hasil uji pewarnaan spora menunjukkan bahwa *Z. mobilis* galur liar jepang tidak membentuk spora sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*. Sel seluruhnya berwarna merah seperti halnya hasil pewarnaan gram (Gambar 4.4), kalau terdapat spora seharusnya terdapat bagian berwarna hijau pada sel dengan letak tertentu.



Gambar 4.4 Hasil uji pewarnaan spora perbesaran 1000x

Z. mobilis merupakan bakteri anaerob fakultatif. *Z. mobilis* galur liar jepang memiliki hasil uji positif bakteri anaerob fakultatif, hal ini ditunjukkan oleh pertumbuhan bakteri pada media *Thioglycollate agar* yang terdapat di sepanjang tabung reaksi (Gambar 4.5), medium yang berwarna pink merupakan daerah yang memiliki oksigen sedangkan pada daerah medium yang berwarna kuning tidak terdapat oksigen. Perbedaan warna tersebut disebabkan oleh adanya pewarna resazurin yang akan berwarna merah muda dengan adanya oksigen dan akan tidak berwarna dalam keadaan tereduksinya. *Z. mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen.



Gambar 4.5 Uji kebutuhan oksigen

Molekul organik bertindak sebagai akseptor elektron pada metabolisme fermentatif sedangkan molekul anorganik bertindak sebagai akseptor elektron dalam metabolisme oksidatif (respirasi). Dalam bakteri aerobik, sitokrom membawa elektron kepada oksigen sebagai akseptor elektron terakhir. Uji oksidase digunakan untuk menentukan keberadaan salah satu dari empat kelompok sitokrom, yakni sitokrom c (Johnson dan Case, 2004). Uji oksidase merupakan sifat khas pada *Z. mobilis*. Hasil uji oksidase pada *Z. mobilis* galur liar jepang negatif (tidak terjadi perubahan warna) (Gambar 4.6) sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*. Dalam proses anaerob, senyawa organik selain oksigen bertindak sebagai akseptor elektron terakhir.



Gambar 4.6 Uji oksidase

Selama respirasi aerobik, atom hidrogen dapat bergabung dengan oksigen membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat mematikan bagi sel. Kebanyakan organisme aerob menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. *Z. mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat hidup dengan maupun tanpa adanya oksigen, *Z. mobilis* memiliki enzim katalase (Swings dan De Ley, 1977). Uji katalase pada *Z. mobilis* galur liar jepang menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya buih gas oksigen pada preparat ulas yang ditetesi hidrogen peroksida 3% (Gambar 4.7).

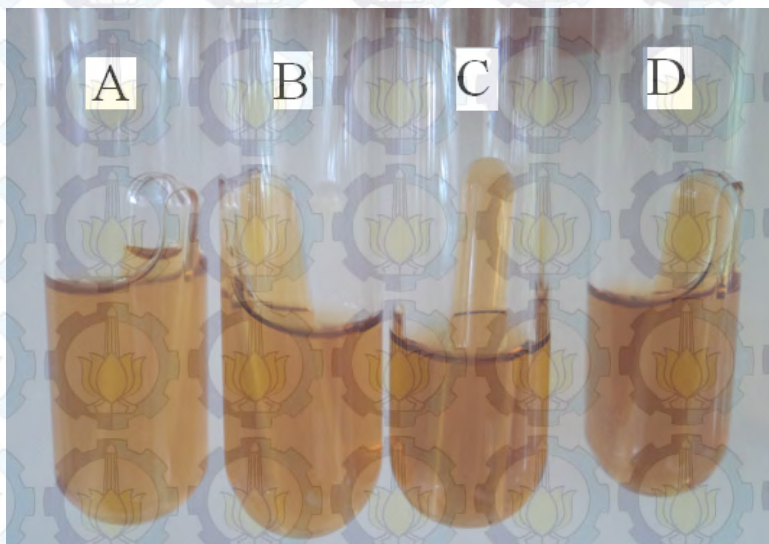


Gambar 4.7 Uji Katalase

Z. mobilis menfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa melalui jalur Etner Doudoroff menghasilkan etanol, CO_2 , dan sejumlah kecil produk lainnya seperti, asam asetat, asam laktat, dan gliserol serta jejak dari asetaldehid dan acetoin. *Z. mobilis* tidak tumbuh dan tidak menfermentasi pati, dekstrin, raffinose, D-trehalose, maltose, laktosa, D-cellobiosa, D-galaktosa, D-mannosa, L-sorbose, salicin, L-rhamnose, D dan L-arabinosa, D-xylose, D-ribosa, D-sorbitol, D-dulsitol, D-mannitol, adonitol, eritritol, gliserol, etanol, Na D-galakturonat, Na D-

L-malate, Na suksinat, Na piruvat, Na DL-Laktat, Na tartrat atau Na sitrat (Swings dan De Ley, 1977).

Uji fermentasi karbohidrat dalam penelitian ini dilakukan pada empat macam substrat yakni glukosa, sukrosa, laktosa dan mannitol. Uji fermentasi karbohidrat positif pada substrat glukosa dan sukrosa (Gambar 4.8 A dan B). Warna medium fermentasi berubah menjadi kuning pada hasil uji positif sedangkan hasil uji negatif pada laktosa dan mannitol membuat medium tetap berwarna kemerahan (Gambar 4.8) *Z. mobilis* galur liar jepang tidak dapat tumbuh pada laktosa maupun mannitol sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*. Perubahan warna medium menjadi kuning disebabkan oleh turunnya pH medium akibat asam organik yang dihasilkan oleh *Z. mobilis*. Keasaman ini disebabkan oleh sejumlah kecil produk fermentasi *Z. mobilis* seperti, asam asetat, asam laktat, jejak dari asetaldehid dan gas CO₂ (Swings dan De Ley, 1977). Perubahan warna menjadi kuning lebih cepat terjadi pada medium sukrosa karena produksi etanol oleh sukrosa menurun hingga 70% dan produk samping yang dihasilkan lebih besar. Gas hanya dihasilkan pada medium sukrosa. Produksi gas terlihat pada tabung durham yang sebagian mediumnya terdorong keluar dan ditempati oleh sejumlah gas (Gambar 4.8 A).



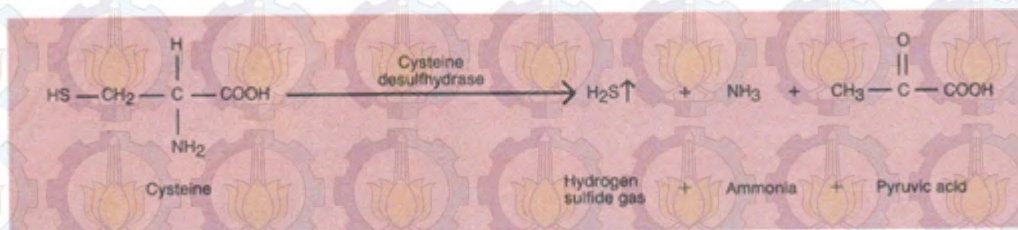
Gambar 4.8 Uji fermentasi karbohidrat (A= sukrosa, B= glukosa, C=laktosa, D= mannitol)

Motilitas bukan merupakan ciri spesifik yang dimiliki oleh *Z. mobilis*. Tiga puluh persen *Z. mobilis* yang ada bersifat non motil (Swings dan De Ley, 1977). Hasil uji motilitas pada *Z. mobilis* galur liar jepang positif. Hal ini diindikasikan oleh pertumbuhan bakteri yang melebar dan terpekat pada permukaan media (Gambar 4.9), sedangkan bila hasilnya negatif maka pertumbuhan hanya akan terdapat pada daerah tusukan jarum inokulasi.



Gambar 4.9 Uji pembentukan H₂S dan motilitas

Uji pembentukan H₂S pada *Z. mobilis* galur liar jepang negatif, ini ditandai dengan tidak terbentuknya endapan hitam pada media SIM (Sulfide Indole Motility) (gambar 4.9). Beberapa peneliti menyatakan bahwa pembentukan H₂S oleh *Z. mobilis* dapat hilang akibat proses pengkulturan ulang dalam laboratorium. Akan tetapi, produksi H₂S merupakan sifat yang stabil pada beberapa galur, contohnya pada *Z. mobilis* NCIB 8227 dan NCIB 8938, *Zymomonas* tersebut telah dikulturkan selama bertahun-tahun dan masih menghasilkan H₂S ketika dites (Milis, 1956 dan Dadds, dkk., 1973). Empat puluh dua dari empat puluh lima *Z. mobilis* yang diteliti tidak membentuk H₂S (Swings dan De Ley, 1976).



Gambar 4.10 Sistein desulhydrase (Barnet dan Jane, 1997)

Untuk mengidentifikasi bakteri, khususnya bakteri batang gram negatif bersifat anaerob fakultatif, mikrobiologis menentukan apakah bakteri tersebut menghasilkan enzim sistein desulfhydrase yang mampu mendegradasi asam amino. Bakteri yang memproduksi enzim sistein desulfhydrase mampu melepas gugus asam amino sistein dari gugus sulfhydryl (-SH) dan gugus aminonya (Gambar 4.10). Untuk menentukan apakah suatu kultur menghasilkan H₂S, mikrobiologis mengecek keberadaan hidrogen sulfida dimana hidrogen sulfida bereaksi dengan logam besi yang terdapat dalam medium membentuk endapan hitam FeS.

Sumber sulfur yang biasa digunakan dalam medium sintetik antara lain: Metionin, tiamin, sulfit, sulfat dan sistein. Sumber utama H₂S yang dihasilkan oleh *Z. mobilis* dalam minuman fermentasi Bir dan *Wort* berasal dari sulfat. Peningkatan konsentrasi sulfat antara 0-500 mg/l dapat meningkatkan produksi H₂S. Penambahan ion Zink juga dapat menstimulasi produksi H₂S. Akan tetapi, penambahan panthotenat memiliki efek yang sebaliknya, peningkatan konsentrasi pantotenate dari 0-40 µg/l menurunkan produksi H₂S (Anderson dan Howard, 1974). Berdasarkan hasil penelitian terdahulu dapat disimpulkan bahwa pembentukan H₂S bukan merupakan karakteristik yang khas bagi *Z. mobilis* dan *Z. mobilis* galur liar jepang termasuk *Z. mobilis* yang tidak menghasilkan H₂S.

Uji pembentukan indol adalah untuk menentukan apakah bakteri tersebut memiliki enzim triptopanase yang dapat melepas indol dari triptopan. Indol yang terlepas akan bereaksi dengan reagen *kovac* membentuk warna kemerahmudaan (*pinkish red*). *Z. mobilis* tidak memiliki enzim triptopanase sehingga hasil uji pembentukan indolnya negatif sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*. Lapisan atas media terbentuk cincin yang berwarna bening agak kehijauan (gambar 4.11).



Gambar 4.11 Hasil uji indol

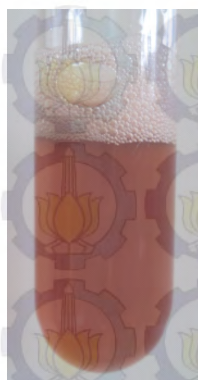
Uji Metil Red-Voges Proskauer (MRVP) digunakan untuk membedakan antara organisme yang memproduksi sejumlah besar asam organik dari glukosa dan organisme yang memproduksi produk netral *acetoin*. Jika *Z. mobilis* galur liar jepang memproduksi sejumlah besar asam organik dari glukosa maka medium akan tetap berwarna merah ketika ditambah metil merah yang mengindikasikan hasil uji MR positif dengan pH dibawah 4,4. Jika produk netral yang dihasilkan, metil merah akan berubah warna menjadi kuning, mengindikasikan bahwa pH di atas 6,0. pH medium sebelum ditambah metil merah dicek menggunakan strip pH indikator hasilnya pH=7. Warna medium setelah ditambah metil merah tetap berwarna kuning (Gambar 4.12). Hasil uji MR pada *Z. mobilis* galur liar jepang negatif sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*.



Gambar 4.12 Uji Metil Merah

Produksi *acetoin* dideteksi dengan penambahan kalium hidroksida dan α -naftol. Jika terdapat *acetoin*, medium akan berwarna merah (*pinkish red*); uji VP negatif akan mengubah medium menjadi berwarna coklat muda. Uji VP pada *Z. mobilis*

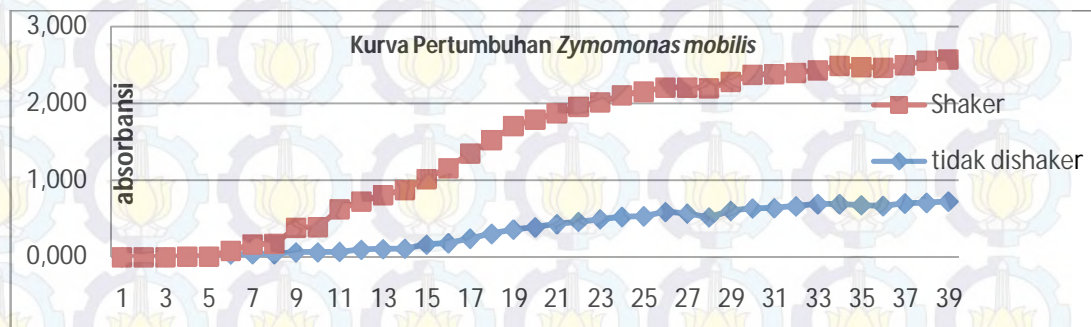
galur liar jepang hasilnya positif (gambar 4.13). *Bergeys manual determinology* menyebutkan hasil uji *Z. mobilis* negatif pada uji MR dan hasil uji VP positif. *Acetoin* dalam *Z. mobilis* diproduksi dalam jumlah kecil saja (*trace*) tanpa adanya aerasi. *Acetoin* dipengaruhi oleh aerasi dimana semakin banyak kadar oksigen maka *acetoin* yang dihasilkan semakin meningkat. Peningkatan produksi *acetoin* juga bisa dilakukan dengan menambahkan asetaldehid dalam medium fermentasi glukosa atau sukrosa. Dua puluh hingga 35% substrat akan diubah menjadi *acetoin*. Empat puluh dua koleksi *Z. mobilis* yang diteliti semua menghasilkan jejak asetilmetilkarbinol (*acetoin*). (Swings dan De Ley, 1977). Shimwell (1937) dan Milis (1956) memberikan hasil negatif pada uji VP kemungkinan karena kondisi tes yang berbeda, sensitivitas atau karena keduanya.



Gambar 4.13 Uji Voges-Proskauer

4.2 Efek aerasi pada pertumbuhan *Z. mobilis* galur liar

Zymomonas Mobilis merupakan bakteri fakultatif anaerob yang memiliki kadar toleransi terhadap oksigen yang berbeda-beda antar galur. Pengaruh aerasi diteliti pada *Z. mobilis* galur liar dan dihasilkan kurva pertumbuhan seperti pada gambar 4.14. *Z. mobilis* galur liar jepang mengalami fasa lag selama 5 jam baik pada medium yang diaerasi maupun yang tidak diaerasi (Gambar 4.14). Fase lag disebabkan oleh tingginya tekanan osmosis akibat ditumbuhkan pada medium gula dengan konsentrasi tinggi sehingga pertumbuhan sel terhambat. *Z. mobilis* mampu tumbuh dalam lingkungan dengan kadar gula tinggi akibat memproduksi sorbitol. Sorbitol memiliki fungsi fisiologis yang penting yakni memberi osmoproteksi terhadap *Z. mobilis* (Loos, dkk., 1994).



Gambar 4.14 Kurva pertumbuhan dengan efek aerasi dan tanpa aerasi

Fase pertumbuhan diperlambat pada media yang diaerasi lebih singkat yakni hanya selama 3 jam sedangkan pada media yang tidak diaerasi fase pertumbuhan diperlambat berlangsung lebih lama yakni selama 8 jam. Aerasi membuat pertumbuhan sel lebih cepat. Organisme aerotoleran seperti *Z. mobilis* memiliki mekanisme penyingkiran turunan oksigen yang berbahaya seperti H_2O_2 . Hal ini dapat dilakukan oleh *Z. mobilis* karena terdapat enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi oksigen dan air (Swings dan De Ley, 1977). Aktivitas dari enzim katalase *Z. mobilis* tidak terpengaruh oleh aerasi (Belaich dan Senez, 1965). *Z. mobilis* juga menunjukkan aktivitas superoksida dismutase lima kali lebih tinggi dalam sel pada kultur aerobik (aerasi) daripada kultur anaerobik (tidak diaerasi). Pertumbuhan sel yang lebih cepat ketika diaerasi juga dapat disebabkan oleh kadar etanol yang dihasilkan lebih rendah pada kultur yang diaerasi sehingga hambatannya untuk tumbuh lebih kecil (Bringer, dkk., 1984). Pertumbuhan *Z. mobilis* mulai menurun setelah mencapai waktu inkubasi 48 jam. Data kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa pertumbuhan *Z. mobilis* lebih baik dalam kondisi diaerasi dengan kecepatan 120 rpm. Sorbitol dihasilkan oleh enzim GFOR yang merupakan enzim konstitutif sehingga pertumbuhan yang baik akan menghasilkan hasil yang lebih baik pula sehingga proses fermentasi sukrosa menjadi sorbitol akan dilakukan dengan kondisi diaerasi.

4.3 Pembuatan inokulum *Zymomonas mobilis*

Proses fermentasi pembentukan sorbitol dari substrat sukrosa menggunakan inokulum yang ditumbuhkan dalam medium glukosa. Tujuan

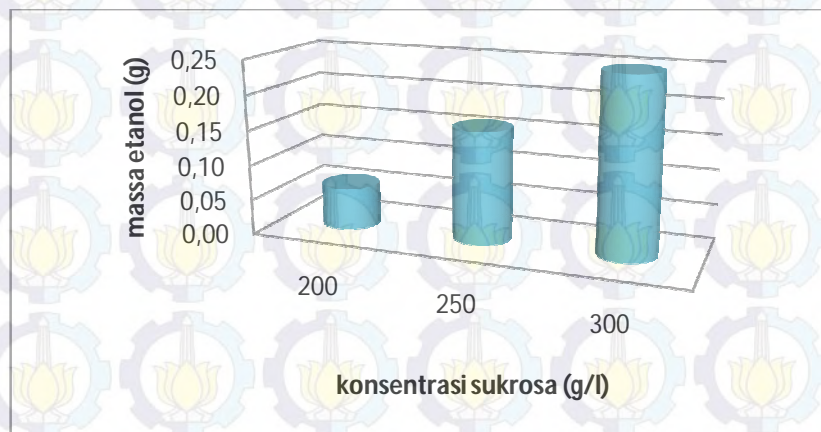
pembuatan inokulum adalah membuat bakteri dapat lebih cepat menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan yang baru dan memperoleh biomassa dalam jumlah besar. Sorbitol terbentuk oleh enzim GFOR sedangkan enzim GFOR yang terbentuk dalam medium glukosa 20% (m/v) memiliki aktifitas GFOR tiga kali lipat lebih besar daripada aktivitas GFOR dalam medium komposit glukosa-fruktosa dan yield biomasanya paling besar (Zachariou dan Scopes, 1986). Akan tetapi sorbitol yang dihasilkan pada medium glukosa atau fruktosa kecil jumlahnya, sorbitol paling besar dihasilkan dalam medium campuran glukosa-fruktosa (atau sukrosa). Sehingga pertama *Z. mobilis* ditumbuhkan dalam inokulum glukosa untuk memperbesar jumlah biomassa dan memperbesar aktivitas GFOR dalam sel bakteri kemudian baru biomassa tersebut diinokulasikan ke dalam medium fermentasi sukrosa untuk meneliti profil fermentasi sukrosa menjadi sorbitol oleh *Z. mobilis*.

Semua bahan dilarutkan dan disetrilkan secara terpisah dan diukur pHnya serta disesuaikan menjadi pH 6 dengan penambahan NaOH dan H₂SO₄. Pengaturan pH dilakukan pada range pH sekitar 6 karena enzim GFOR yang berperan dalam menghasilkan sorbitol aktif pada pH 4,5 sampai 7,5 dan mencapai pH optimum 6,2 yang setara dengan pH intraselular dari 6,4 hingga 6,8 (Zachariou dan Scopes, 1986). Suhu inkubasi diatur pada suhu 39°C. Suhu inkubasi ini dipilih karena merupakan suhu optimum bagi enzim GFOR (Zachariou dan Scopes, 1986). Kecepatan pengadukan diatur pada 120 rpm, *Z. mobilis* galur liar Jepang tumbuh lebih baik dalam kondisi diaerasi sehingga pembuatan inokulum dilakukan dengan kondisi diaerasi.

4.4 Pemilihan konsentrasi sukrosa

Penelitian fermentasi sukrosa menjadi sorbitol oleh *Z. mobilis* telah dilakukan pada beberapa konsentrasi sukrosa dari 50 g/l hingga 400 g/l. Sorbitol dan etanol paling banyak dihasilkan pada range sukrosa antara 200-300 g/l sedangkan pada konsentrasi sukrosa di atas 300 g/l sorbitol dan etanol yang dihasilkan menurun secara drastis dan bahkan pada konsentrasi 400 g/l tidak dihasilkan sorbitol sama sekali. *Z. mobilis* IFO 23756 menghasilkan sorbitol maupun etanol terbesar pada konsentrasi sukrosa 250 g/l. (Sookkheo, dkk., 1991).

Z. mobilis memiliki tingkat toleransi yang berbeda antar satu galur dengan yang lain sehingga terdapat perbedaan kemampuan antar satu galur dengan yang lain. Penelitian diawali dengan optimasi konsentrasi sukrosa yang digunakan untuk proses fermentasi. Penelitian ini menggunakan range konsentrasi sukrosa 200, 250, dan 300 g/l untuk mengetahui konsentrasi optimum pembentukan etanol pada *Z mobilis* galur liar Jepang.



Gambar 4.15 Perbandingan hasil etanol pada beberapa konsentrasi sukrosa oleh *Zymomonas mobilis* galur liar pada proses fermentasi selama 24 jam

Hasil fermentasi tiap media dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda disentrifugasi untuk memisahkan biomassa dan supernatannya. Etanol yang berada di supernatant didapatkan dengan destilasi menggunakan kolom vigreux (Gambar 4.16)

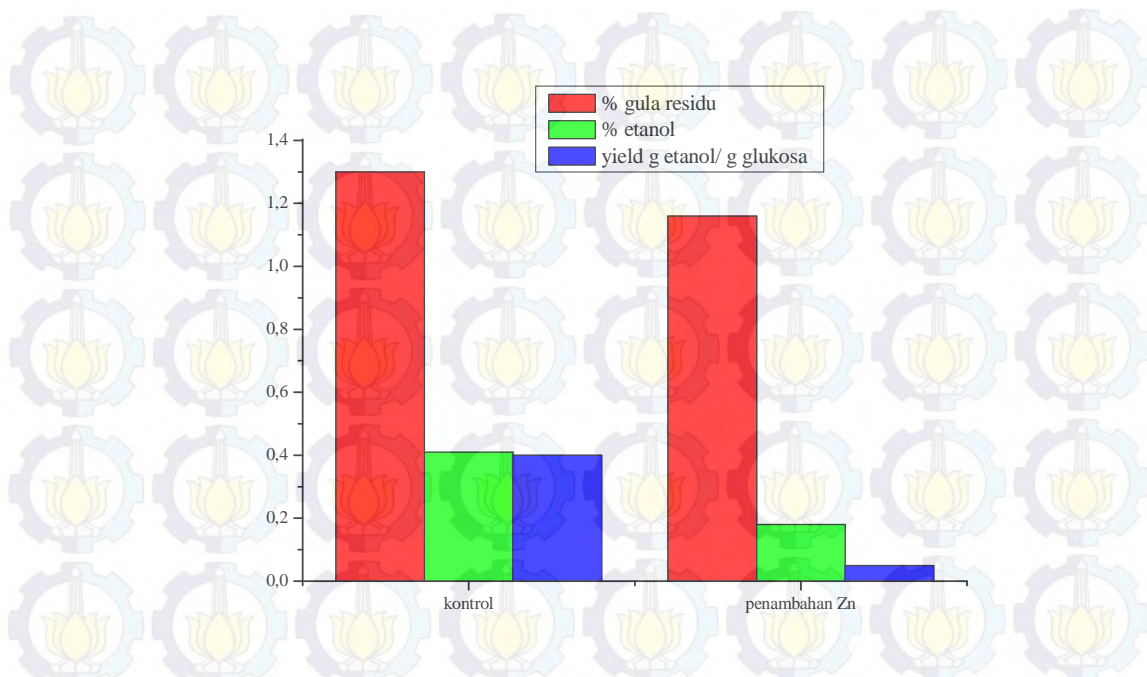


Gambar 4.16 Destilasi supernatan menggunakan kolom vigreux

Etanol paling banyak terbentuk pada konsentrasi sukrosa 300 g/l (Gambar 4.15) hal ini disebabkan pertama karena substrat glukosanya lebih besar dan yang kedua kekentalan medium semakin besar seiring bertambahnya konsentrasi sukrosa sehingga difusi oksigen akibat adanya aerasi lebih sulit masuk pada konsentrasi sukrosa tinggi sehingga akan menekan respirasi dan menguntungkan bagi fermentasi etanol. Keuntungan ini tidak terjadi pada medium sukrosa dengan konsentrasi di atas 300 g/l. Konsentrasi sukrosa di atas 300 g/l tekanan osmosisnya terlalu besar sehingga menekan pertumbuhan *Z. mobilis* konsekuensinya hasil sorbitol maupun etanolnya menurun secara drastis. Media sukrosa dengan konsentrasi 300 g/l ini kemudian divariasikan antara kontrol (tanpa penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan perlakuan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Pemilihan konsentrasi sukrosa 300 g/l dimana etanol yang dihasilkan paling besar, diharapkan dengan adanya penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dapat menghambat pembentukan etanol dengan cara mengalihkan pembentukan etanol ke arah sorbitol maka sorbitol yang dihasilkan akan semakin besar.

4.5 Penentuan pola fermentasi sukrosa menjadi etanol

Z. mobilis dapat menfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa menjadi etanol dan sejumlah produk samping lainnya seperti sorbitol, levan, dihidroksi aseton, asam laktat, dan lain sebagainya melalui jalur Etner-Doudoroff. Hasil bersih jalur ini adalah 2 mol etanol dan 2 mol karbondioksida. Fermentasi etanol dan sorbitol memiliki kondisi optimum yang berbeda. Fermentasi etanol optimum dalam kondisi anaerob sedangkan pembentukan sorbitol lebih optimum dengan keberadaan oksigen dengan level tertentu karena berdasarkan penelitian terdahulu ketika medium fermentasi benar-benar ditiadakan oksigennya maka hasil sorbitolnya menurun sedangkan pada media dengan tingkat oksigen tertentu hasil sorbitolnya lebih besar.



Gambar 4.17 Perbandingan hasil fermentasi *Zymomonas mobilis* galur liar jepang antara kontrol dan penambahan Zn^{2+} pada waktu fermentasi 48 jam

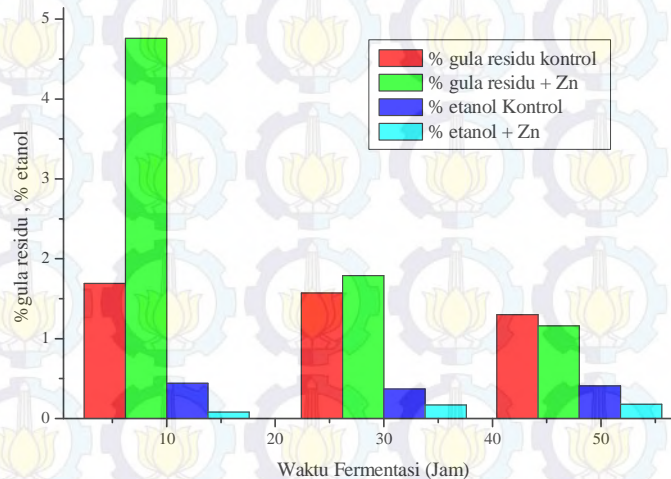
Pola fermentasi etanol menggunakan *Z. mobilis* galur liar dengan dan tanpa penambahan Zn (kontrol) didapatkan dengan melakukan fermentasi selama 48 jam. Pengukuran kadar etanol dan residu glukosa dilakukan setiap 10 jam dan terakhir pada waktu inkubasi 48 jam. Pola fermentasi etanol tanpa penambahan Zn (kontrol) menunjukkan bahwa pembentukan etanol seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi yieldnya semakin meningkat sedangkan dengan penambahan Zn yield etanolnya semakin menurun.

Tabel 4.1 Yield g etanol/g glukosa antara kontrol dan penambahan Zn

Waktu fermentasi	Yield g etanol/g glukosa		Jumlah biomassa		Yield (%)	
	Kontrol	Penambahan Zn	Kontrol (x10000)	Penambahan Zn (x10000)	Kontrol	Penambahan Zn
10	0,08	0,25	120	0.2	16,06	50,92
30	0,18	0,05	231	27,9	35,91	10,49
48	0,4	0,05	424	90	79,04	9,41

Data menunjukkan bahwa yield etanol tertinggi selama fermentasi 48 jam untuk kontrol adalah 0.40 g etanol/g glukosa, jauh lebih tinggi delapan kali lipat dibandingkan hasil yield etanol dengan penambahan Zn (Tabel 4.1). Hal ini sesuai

dengan hipotesis bahwa penambahan Zn menghambat pembentukan etanol dan mengarahkan ke pembentukan sorbitol.

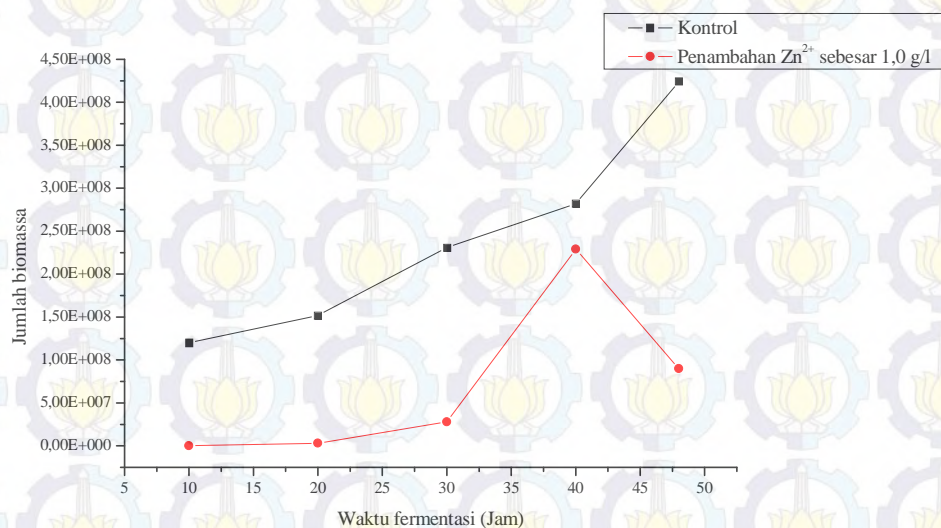


Gambar 4.18 Perbandingan % etanol dan % gula residu pada media fermentasi kontrol dan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 1 g/l dengan variasi waktu fermentasi 10, 30 dan 48 jam.

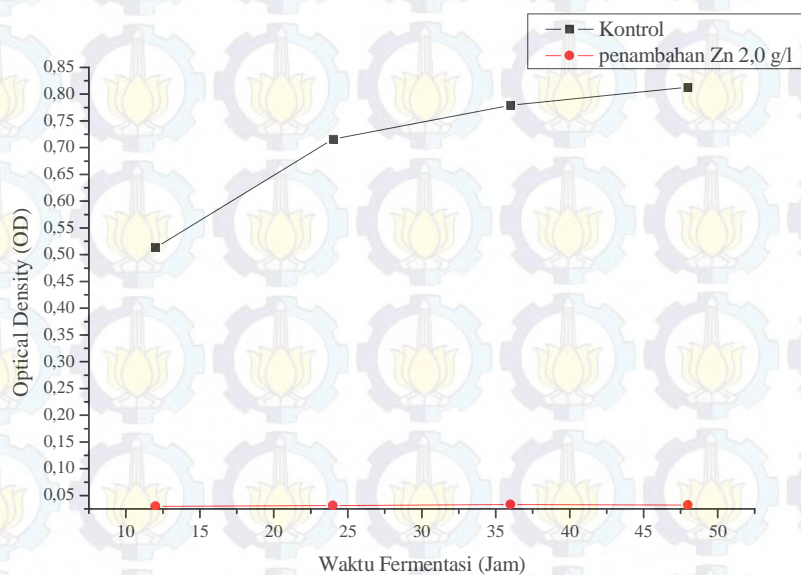
4.6 Penentuan jumlah biomassa *Z. mobilis* galur liar dengan dan tanpa penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Data biomassa menunjukkan bahwa penambahan Zn mempunyai efek penghambatan yang cukup besar terhadap pertumbuhan biomassa *Z. mobilis*. Penambahan Zn bertujuan untuk menghambat enzim-enzim dalam pembentukan etanol dan salah satu enzim yang dihambat juga merupakan enzim yang mengarah pada pembentukan biomassa. Liu dkk telah meneliti efek penghambatan Zn dalam beberapa konsentrasi yakni 0,1 g/l; 1,0 g/l; dan 2,0 g/l. Berdasarkan hasil sorbitol dan etanol, konsentrasi penambahan Zn optimum bagi pembentukan sorbitol oleh *Z. mobilis* rekombinan adalah sebesar 2,0 g/l. Akan tetapi ketika dilakukan penambahan Zn sebesar 2,0 g/l *Zymomonas mobilis* galur liar hampir tidak mengalami pertumbuhan sama sekali, sedangkan pada media kontrol *Z. mobilis* dapat tumbuh dengan baik (Gambar 4.20). Hal ini tidak sesuai dengan harapan, maka dicoba ditambahkan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 1,0 g/l. Pada medium ini *Zymomonas mobilis* galur liar jepang dapat tumbuh dan mengalami peningkatan jumlah biomassa. Pertumbuhan biomassa maksimum pada jam ke-48 untuk media kontrol sedangkan pada medium dengan penambahan Zn jumlah biomassa

maksimum pada jam ke-40 (Gambar 4.19). Jumlah biomassa ini nanti akan digunakan untuk menghitung produktivitas pembentukan etanol dan produk lain dari *Z. mobilis*.



Gambar 4.19 Pola pertumbuhan sel *Zymomonas mobilis* galur liar tanpa dan dengan penambahan Zn²⁺

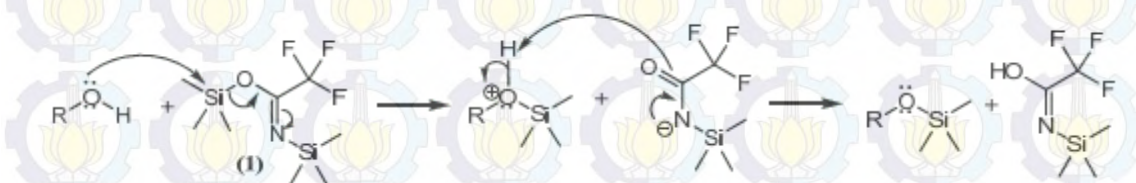


Gambar 4.20 Kurva pertumbuhan *Z. mobilis* antara kontrol dan penambahan ZnSO₄.7H₂O sebesar 2,0 g/l dengan penentuan secara turbidimetri (kekeruhan).

4.7 Penentuan pola fermentasi sukrosa menjadi sorbitol

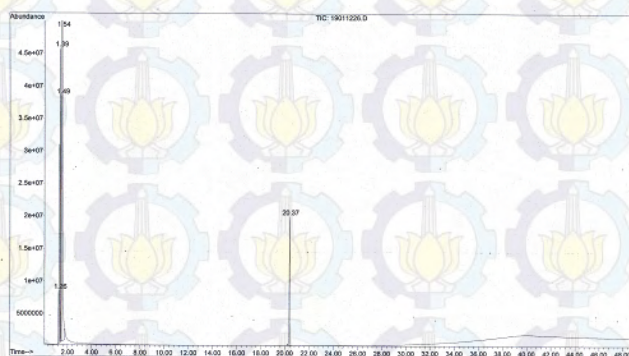
Metode GC-MS dapat digunakan dengan cara mengubah polaritas karbohidrat atau gula-gula yang hendak dianalisis. Hal ini dilakukan dengan mengubah gugus fungsi hidroksil menjadi silyl eter. N,O-bis(trimetilsilyl)trifluoroacetamida (BSTFA) digunakan sebagai reagen penderivatisasi. Supernatan hasil sampling setelah perlakuan penambahan metanol dan disentrifus, supernatannya dikeringkan pada suhu 60°C dan dilarutkan dalam piridin, BSTFA ditambahkan, campuran dipanaskan dalam vial tahan tekanan, pada 90°C, selama 1 jam. Produk hasil derivatisasi disentrifus dan supernatan diinjeksikan ke GC-MS sebanyak 1 µl.

Reaksi secara umum untuk pembentukan turunan trialkilsilyl oleh reagen BSTFA ditunjukkan dalam gambar 4.21.

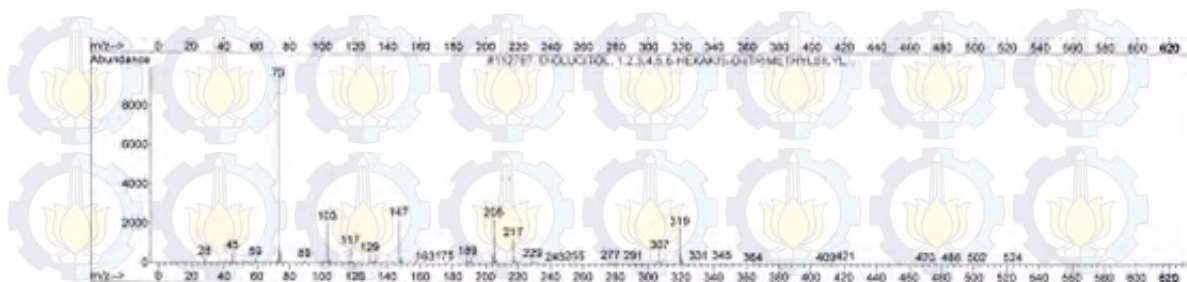


Gambar 4.21 Reaksi pembentukan turunan trialkilsilyl pada gugus fungsi hidroksil (Mogosan, G., dkk., 2011).

Gambar 4.22 menunjukkan kromatogram GC dari senyawa pembanding (senyawa standard) sorbitol 100 ppm. Sorbitol (D-Glucitol) mempunyai waktu retensi 20,37 menit. Gambar 4.23 menunjukkan kromatogram spektra massa D-Glucitol (sorbitol) yang digunakan sebagai senyawa standard.



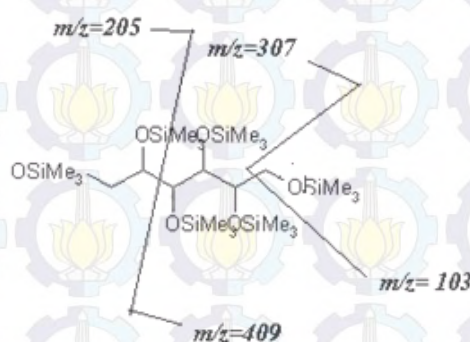
Gambar 4.22 Kromatogram GC sorbitol



Gambar 4.23 Kromatogram MS sorbitol

Ion (m/z) yang paling melimpah dari fragmentasi turunan trimetilsilyl sorbitol adalah 73, 103, 147, 205, 217, 307 dan 319.

Berdasarkan kromatogram spektra massa sorbitol (Gambar 4.23) disarankan pembentukan ion (m/z) sebagai berikut:



4.24 Pola fragmentasi Sorbitol

Sampel hasil fermentasi yang dianalisa dengan cara yang sama sebagaimana senyawa standard tidak menunjukkan puncak pada menit ke 20,37 sehingga disimpulkan bahwa tidak terdapat sorbitol di dalam supernatan hasil fermentasi. Hal ini berlawanan dengan hipotesa awal bahwa *Zymomonas mobilis* apabila ditumbuhkan dalam medium dengan konsentrasi gula yang tinggi akan menghasilkan sorbitol yang berfungsi untuk memberikan perlindungan terhadap tingginya tekanan osmosis. Sorbitol tidak ditemukan baik dalam medium kontrol maupun pada medium dengan perlakuan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Hal ini berlawanan dengan data etanol yang dihasilkan semakin menurun dengan perlakuan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Perlu dicari senyawa apakah yang terbentuk apabila tidak terbentuk sorbitol. Senyawa hasil samping selain sorbitol juga terdapat levan yang merupakan senyawa fruktooligopolimer. Pembentukan levan

dapat diamati setelah inokulasi yang tampak putih seperti awan (cloudiness) dan jumlahnya dapat dihitung dengan cara diendapkan. Levan dapat terjadi dalam bentuk tidak terendapkan. Levan yang dapat mengendap hanya terdiri atas fruktosa sedangkan levan dalam bentuk tidak terendapkan mungkin mengandung glukosa. Hal ini disimpulkan dari penelitian bahwa setelah dilakukan hidrolisis levan selain terjadi peningkatan konsentrasi fruktosa juga terjadi peningkatan konsentrasi glukosa. Levan paling banyak terdapat dalam bentuk tak-terendapkan, hal ini mengindikasikan bahwa levan memiliki berat molekul yang rendah (Viikari, L. 1984).

Indikasi terdapatnya levan di dalam supernatan adalah medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pada proses fermentasi 48 jam lebih keruh daripada medium kontrol akan tetapi jumlah bakteri di dalam medium kontrol ternyata lebih besar. Kemungkinan kekeruhan medium diakibatkan oleh adanya levan di dalam medium. Hal ini lebih didukung lagi dengan adanya endapan putih yang terbentuk ketika supernatan hasil fermentasi ditambah metanol dengan perbandingan 1:1 lalu disentrifuge. Endapan putih lebih banyak terbentuk dalam medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Gambar 4.25).



Gambar 4.25 Supernatan setelah penambahan metanol dan disentrifuse

Perbedaan hasil antara penelitian dengan perlakuan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pada *Zymomonas mobilis* rekombinan (Liu, dkk., 2010) dengan *Zymomonas mobilis* galur liar Jepang terletak pada karakteristik yang dimiliki oleh masing-masing *Zymomonas*. *Z. mobilis* rekombinan merupakan *Zymomonas* yang dibuat dengan menggabungkan plasmid *Z. mobilis* galur liar dengan plasmid *E. coli* untuk over-ekspresi enzim GFOR. Sedangkan *Zymomonas mobilis* galur

liar secara alami hanya menghasilkan levansucrase yang berfungsi sama seperti invertase yakni menghidrolisis sukrosa. Sedangkan *Z. mobilis* rekombinan selain menghasilkan enzim levansucrase juga menghasilkan enzim invertase akibat kombinasi dengan plasmid *E. coli* yang merupakan bakteri penghasil invertase. Levansukrase juga bertanggung jawab atas pembentukan levan (fructooligopolimer), produk samping utama selain sorbitol dalam fermentasi etanol pada media sukrosa.

Laju hidrolisis sukrosa oleh *Z. mobilis* rekombinan lebih cepat daripada *Z. mobilis* galur liar. Dalam fermentasi sukrosa, aktivitas levansukrase/invertase yang tinggi mengakibatkan menumpuknya gula monomer dalam medium dan mengakibatkan terbentuknya sorbitol. Galur yang memiliki aktivitas hidrolisis yang rendah maka diperkirakan yield sorbitolnya rendah (Viikari, L., 1984). Laju hidrolisis sukrosa yang tinggi terkait dengan pembentukan sorbitol dan laju hidrolisis yang rendah terkait dengan pembentukan levan (Viikari dan Gisler, 1986). *Z. mobilis* diperkirakan menghasilkan sorbitol dalam kadar rendah yang cukup untuk melindunginya dari tekanan osmosis karena enzim GFOR merupakan enzim konstitutif sehingga sorbitol merupakan produk yang pasti dihasilkan. Tidak munculnya sorbitol dalam kromatogram GC dapat disebabkan oleh kecilnya jumlah sorbitol sehingga tidak terdeteksi ketika dianalisa menggunakan metode yang digunakan atau sorbitol yang dihasilkan tidak disekresikan keluar oleh sel *Z. mobilis*. Hal ini masih perlu diteliti lebih lanjut.

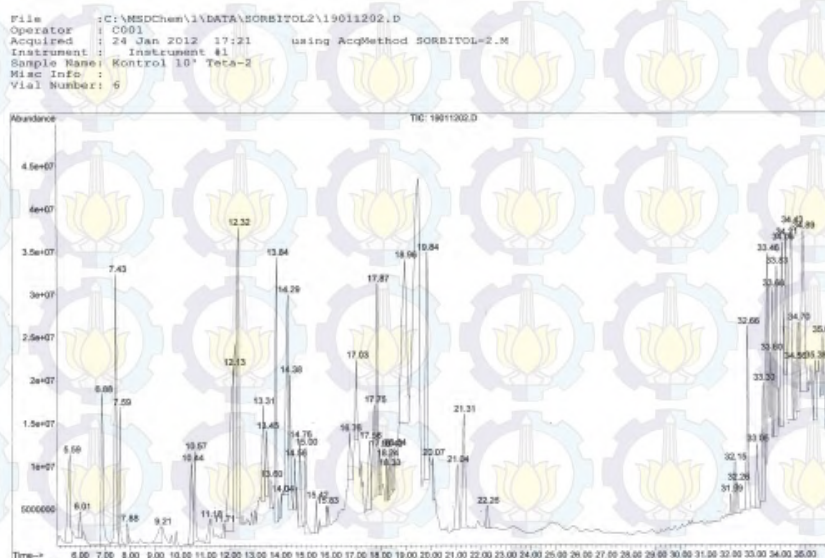
Jika sorbitol memang dihasilkan tetapi dalam kadar yang sangat rendah, rendahnya kadar sorbitol tersebut dapat disebabkan oleh rendahnya laju hidrolisis sukrosa oleh *Z. mobilis* galur liar sehingga tidak terjadi penumpukan fruktosa. Sorbitol tidak akan terakumulasi secara signifikan kecuali fruktosa terdapat pada konsentrasi yang cukup tinggi. Enzim GFOR yang menghasilkan sorbitol memiliki afinitas yang rendah dan ia tidak dapat mengkatalisis pembukaan cincin fruktosa sedangkan bentuk fruktosa dengan cincin terbuka terdapat hanya 0,01% dari total fruktosa (Zachariou dan Scopes, 1986). Penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tidak menghambat fruktokinase sehingga kemungkinan sebagian besar fruktosa hasil hidrolisis lebih mengarah pada pembentukan 6-P-fruktosa maupun kearah

pembentukan levan. Inhibisi oleh glukosa nampaknya tidak terlalu besar disebabkan oleh rendahnya laju hidrolisis sukrosa oleh *Z. mobilis* galur liar.

Cara mengatasi masalah yang terjadi adalah dengan menambahkan invertase ke dalam medium sukrosa. Invertase yang ditambahkan akan bersaing dengan hidrolisis sukrosa oleh *Z. mobilis*. Karena kebanyakan sukrosa dalam medium dihidrolisis oleh aksi dari invertase, sekresi enzim levansukrase menjadi jarang, konsekuensinya pembentukan levan menjadi terhambat (Lee, W. dan Huang, C., 2000) dan fruktosa yang ada akan lebih mengarah pada pembentukan sorbitol. Invertase yang ditambahkan harus dioptimasi terlebih dahulu. Penambahan invertase yang terlalu besar akan menghambat pertumbuhan *Z. mobilis* akibat tekanan osmosis yang terlalu besar.

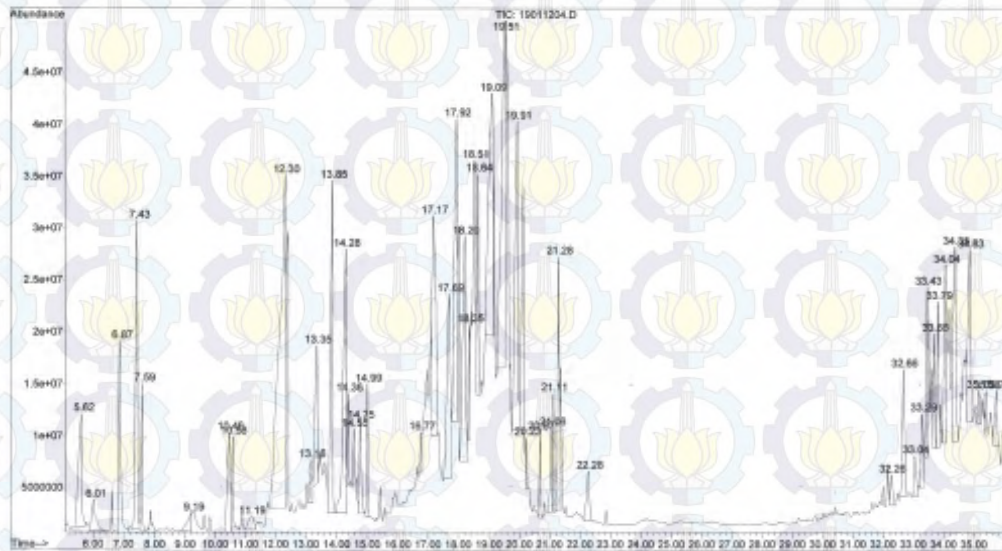
4.8 Senyawa selain sorbitol yang terdapat dalam supernatan hasil fermentasi berdasarkan data GC-MS

Senyawa hasil derivatisasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pola pembentukan senyawa pada medium kontrol dan sampel (gambar 4.26 dan 4.27). Dari keseluruhan puncak senyawa yang ada (Tabel 4.2) hanya 4 buah puncak (tabel 4.3) yang dapat diidentifikasi berdasarkan kesamaan pola fragmentasi antara puncak tersebut dengan pola fragmentasi senyawa referensi.



Gambar 4.26 Kromatogram GC medium kontrol dengan waktu inkubasi 10 jam

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\SORBITOL2\19011204.D
 Operator : C001
 Acquired : 24 Jan 2012 18:41 using AcqMethod SORBITOL-2.M
 Instrument : #1
 Sample Name : Sampel 10³ Tetra-2
 Mass Info :
 Vial Number : 7



Gambar 4.27 Kromatogram GC medium sampel dengan waktu inkubasi 10 jam

Kesulitan dalam menganalisa kromatogram hasil dari GC-MS adalah puncak-puncak yang ada tidak terpisah dengan baik. Semua puncak senyawa yang ada (Tabel 4.2) ketika diperiksa antara kemiripan pola fragmentasi dengan referensi yang ada kebanyakan kemiripannya di bawah 50%. Hal ini terjadi karena overlapping puncak sehingga fragmen dari senyawa lain ikut mempengaruhi pola fragmentasi senyawa sebenarnya. Hal ini dibuktikan dengan puncak yang terpisah dengan baik, pola fragmentasinya sesuai dengan referensi yang ada dengan kemiripan di atas 80%.

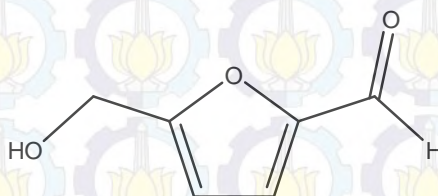
Tabel 4.2 Jumlah senyawa dalam medium kontrol dan medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sampel) pada waktu fermentasi 10, 30 dan 48 jam

Waktu fermentasi	Jumlah puncak senyawa	
	Kontrol	sampel
10	59	48
30	56	36
48	45	49

Tabel 4.3 Puncak senyawa yang dapat diidentifikasi pada kromatogram GC-MS pada waktu fermentasi 10, 30 dan 48 jam

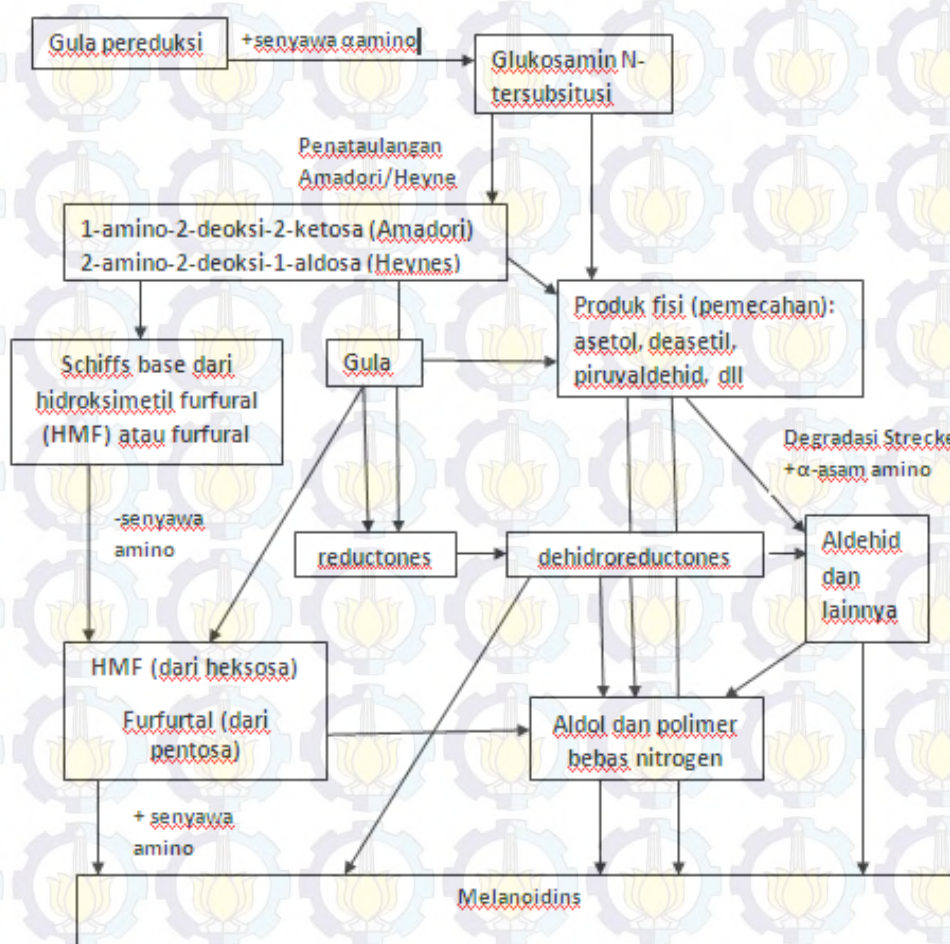
No	Waktu retensi (menit)	Nama senyawa
1	5,6	5-hidroksimetilfurfural (HMF)
2	6,9	silanol trimetil fosfat (3:1)
3	21,3	1,2,3,4,6-pentakis-O-trimetilsilil glukopyranose
4	22,3	1,1-C-dioktil 2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilil-sorbitol

Empat senyawa yang dapat diidentifikasi dapat dilihat dalam tabel 4.3. Senyawa pertama dengan waktu retensi 5,6 menit merupakan senyawa 5-hidroksimetilfurfural (gambar 4.28). Hidroksimetilfurfural (HMF) bukan merupakan produk dari *Z. mobilis* karena tidak terdapat dalam jalur metabolisme sukrosa oleh *Z. mobilis* (Gambar 2.3). HMF merupakan produk degradasi dari heksosa. Senyawa ini mempunyai efek toksik yang sedang terhadap organisme, termasuk di dalamnya sel *Z. mobilis*. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa konsentrasi furfural sebesar 0,09 mg/ml dalam hidrolisat kayu dapat menurunkan hasil etanol oleh *Z. mobilis* rekombinan menjadi sebesar 58% (Ranatunga, T. D., dkk., 1997). Heksosa dalam supernatan yang terdegradasi menjadi senyawa HMF adalah fruktosa. Hal ini menjelaskan alasan tidak munculnya puncak fruktosa di dalam kromatogram GC-MS. Proses degradasi terjadi kemungkinan besar disebabkan oleh proses pengeringan sampel dengan suhu 60°C selama 2 hari sebelum diderivatisasi. Senyawa HMF terbentuk karena terjadi reaksi Maillard.



Gambar 4.28 5-hidroksimetilfurfural

Istilah reaksi Maillard, pencoklatan secara nonenzimatis, dinamakan sesuai dengan penemunya, Louis-Camille Maillard. Reaksi Maillard merupakan istilah bagi sekumpulan reaksi yang terjadi antara senyawa amina dan karbonil sebagaimana ditunjukkan dalam gambar 4.29.



Gambar 4.29 Ringkasan reaksi Maillard (diadaptasi dari Ames 1990)

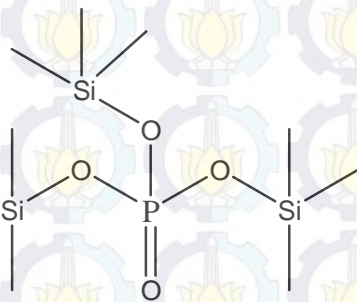
Reaksi Maillard biasanya terjadi pada bahan makanan yang dipanaskan atau dikeringkan. Dalam hal ini, HMF terjadi karena proses pengeringan sampel. Reaksi Maillard terjadi dalam tiga tahap utama dan bergantung pada beberapa faktor seperti pH, waktu, suhu, konsentrasi reaktan dan jenis reaktan (Eriksson, 2005).

Tabel 4.4 Hubungan antara waktu fermentasi dan kadar senyawa hidroksimetilfurfural (HMF)

Waktu fermentasi	kadar senyawa HMF (% terhadap total)	
	Kontrol	sampel
10	1,96	2,09
30	1,36	6,84
48	2,58	2,06

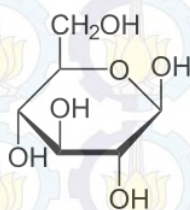
Tidak dapat ditarik kesimpulan antara waktu fermentasi dan kadar senyawa HMF karena tidak terdapat suatu pola tertentu. Hal ini kemungkinan besar terjadi akibat perbedaan pH dan konsentrasi reaktan.

Senyawa kedua dengan waktu retensi 6,9 menit adalah silanoltrimetilfosfat. Silanol trimetil fosfat (Gambar 4.30) tidak terdapat dalam jalur metabolisme sukrosa oleh *Z. mobilis*. Perlu diteliti lebih lanjut asal pembentukan dari silanol trimetilfosfat. Silanol trimetil fosfat dapat berasal dari reagen BSTFA yang dicampur dengan 1% TMCS (Trimetilklorosilan) yang kemudian bereaksi dengan fosfat yang ada di dalam supernatan.



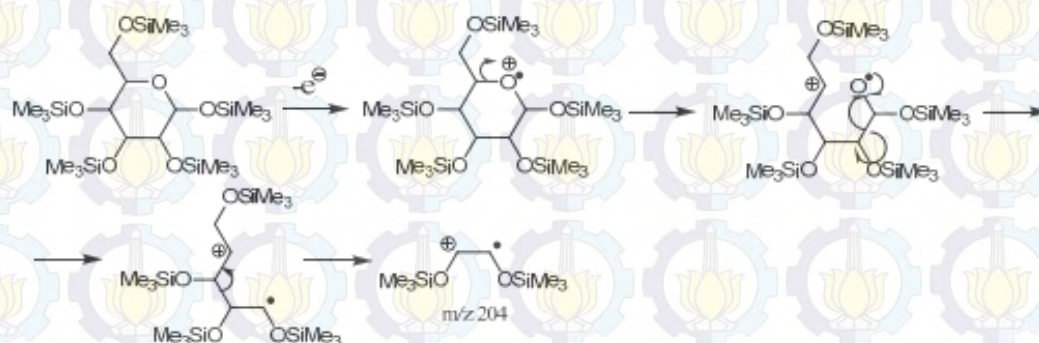
Gambar 4.30 Silanol trimetil fosfat (3:1)

Senyawa ketiga dengan waktu retensi 21,3 menit adalah Glucopyranose (1,2,3,4,6-Pentakis-o-(Trimetilsilyl) hexopyranose). Nama lain dari D-Glucopyranose (gambar 4.31) adalah D-Glucose. Sisa glukosa dalam bentuk cincin pyran dengan metode analisis GC-MS yang digunakan dalam penelitian ini muncul pada puncak dengan waktu retensi 21,3 menit.



Gambar 4.31 β -D-Glucopyranose (Wikipedia)

Proses derivatisasi menggunakan BSTFA akan menyebabkan gugus hidroksil berubah menjadi silyl eter TMS. Berdasarkan pola fragmentasi Glucopyranose (lampiran 12) maka disarankan pembentukan ion yang paling melimpah ($m/z=204$) sebagai berikut:



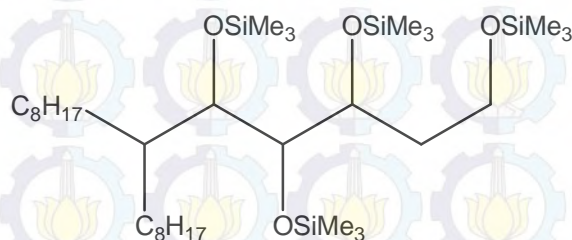
Gambar 4.32 Mekanisme pembentukan ion dalam 1,2,3,4,6-Pentakis-o-(Trimetilsilyl) hexopyranose (Glucopyranose) (Mogosan, G., dkk., 2011).

Urutan kemunculan senyawa dengan menggunakan metode derivatisasi TMS adalah fruktosa, α -glukosa, sorbitol, β -glukosa dan sukrosa (Horwitz, 1975). Puncak dengan waktu retensi 21,3 menit merupakan β -D-Glucopyranose (β -D-Glucose) karena puncak senyawa ini muncul setelah waktu retensi sorbitol.

Tabel 4.5 Hubungan antara kadar glucopyranose terhadap waktu fermentasi

Waktu fermentasi	kadar senyawa Glucopyranose (% area terhadap total)	
	Kontrol	sampel
10	2,48	2,35
30	2,38	1,87
48	2,89	3,03

Senyawa keempat dengan waktu retensi 22,3 menit adalah dioktil sorbitol (Gambar 4.33). Dioktil sorbitol bukan merupakan produk hasil metabolisme sukrosa oleh *Z. mobilis* karena yang terdapat dalam jalur metabolisme adalah sorbitol (Gambar 2.3). Kemungkinan besar, dioktil sorbitol merupakan produk degradasi senyawa lain atau merupakan sorbitol yang bereaksi dengan senyawa lain dalam proses derivatisasi yang terjadi dan menghasilkan dioktil sorbitol atau *Z. mobilis* galur liar ini memang menghasilkan dioktil sorbitol dan bukan sorbitol (D-glucitol). Hal ini dapat menjelaskan tidak munculnya sorbitol dalam hasil analisis akan tetapi hal ini masih perlu diteliti lebih lanjut.



Gambar 4.33 1,1-C-dioktil 2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-sorbitol

Dengan asumsi bahwa dioktil sorbitol merupakan sorbitol yang bereaksi dengan senyawa lain atau sorbitol yang dihasilkan memang dalam bentuk dioktil sorbitol, hubungan antara pembentukan etanol dan dioktil sorbitol dapat ditentukan.

Tabel 4.6 Hubungan antara waktu inkubasi dan kadar dioktil sorbitol

waktu inkubasi	% area dioktil sorbitol terhadap total	
	Kontrol	Sampel
10	0,429	0,833
30	0,458	0,33
48	0,654	0,51

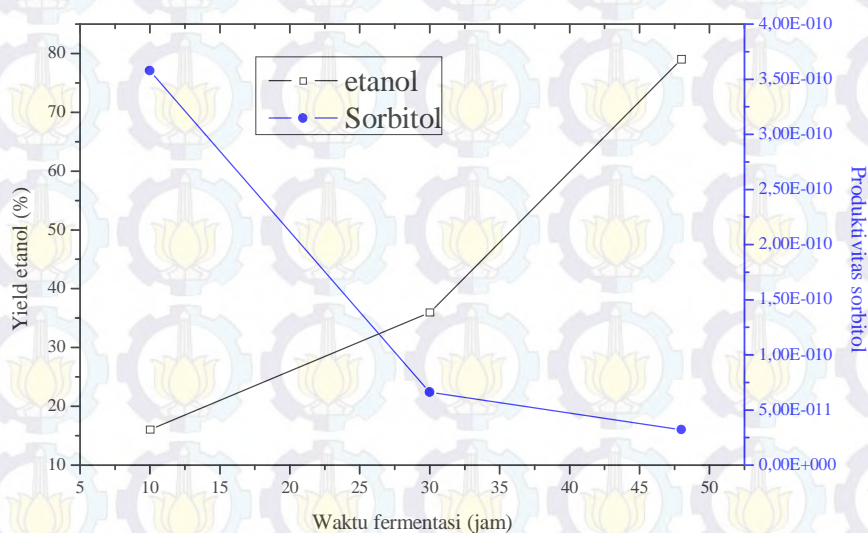
Jumlah dioktil sorbitol pada kontrol naik seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi sedangkan dioktil sorbitol pada sampel paling tinggi pada waktu inkubasi 10 jam kemudian turun pada waktu inkubasi 30 jam dan kemudian naik lagi pada waktu inkubasi 48 jam. Tidak dapat dibentuk pola antara kontrol dan

sampel. Jumlah dioktil sorbitol harus dihitung berdasarkan jumlah dioktil sorbitol yang dihasilkan oleh tiap bakteri sehingga bisa ditarik kesimpulan yang jelas.

Tabel 4.7 Hubungan antara produktivitas dioktil sorbitol terhadap waktu fermentasi

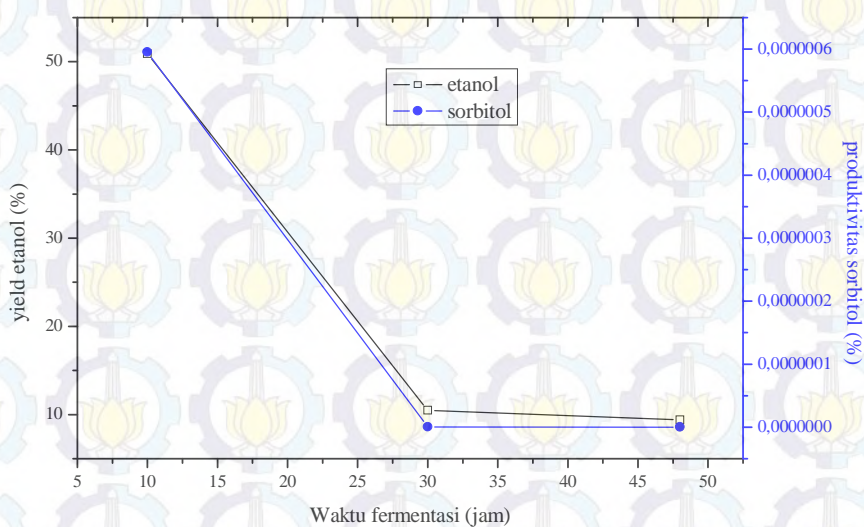
Waktu inkubasi	% area dioktil sorbitol terhadap total		Jumlah bakteri		Produktivitas (% dioktil sorbitol/sel/jam)	
	Kontrol	Sampel	Kontrol ($\times 10^8$)	Sampel ($\times 10^7$)	Kontrol ($\times 10^{-10}$)	Sampel ($\times 10^{-10}$)
10	0,429	0,833	1,2	0,01	3,6	5960
30	0,458	0,33	2,3	2,8	0,7	3,9
48	0,654	0,51	4,2	9	0,3	1,2

Terdapat perbedaan pola pembentukan etanol dan dioktil sorbitol pada medium kontrol dan medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Pembentukan etanol dan sorbitol berlawanan pada medium kontrol, ketika sorbitol menurun hasil etanol justru meningkat (gambar 4.34) sedangkan pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pola pembentukan etanol dan sorbitol sejalan, jumlah etanol dan sorbitol menurun dengan bertambahnya waktu fermentasi (gambar 4.35).



Gambar 4.34 Pola kurva yield etanol dan produktivitas dioktil sorbitol pada medium kontrol

Pada medium kontrol, jumlah enzim GFOR sudah diperbanyak dalam proses pembuatan inokulum glukosa. Ketika inokulum dimasukkan dalam medium fermentasi kontrol, *Z. mobilis* mulai menghidrolisis sukrosa dan di awal pertumbuhannya jumlah glukosa dan fruktosa hasil hidrolisis masih melimpah karena laju konsumsi glukosa masih rendah dan laju konsumsi fruktosa lebih rendah lagi daripada glukosa sedangkan jumlah biomassa masih sedikit. Sorbitol paling tinggi dihasilkan pada waktu fermentasi 10 jam. Pada awal fermentasi, glukosa yang masih melimpah menghambat kerja enzim fruktokinase, enzim yang mengubah fruktosa menjadi fruktosa-6-fosfat, sehingga fruktosa yang ada direduksi oleh enzim GFOR menjadi sorbitol. Kelimpahan glukosa dan fruktosa semakin berkurang seiring bertambahnya waktu inkubasi sedangkan jumlah biomassa makin meningkat sehingga penghambatan enzim fruktokinase oleh glukosa semakin kecil. Sejumlah fruktosa-6-fosfat mulai terbentuk dan jumlah sorbitol yang dihasilkan semakin turun karena bertambahnya jumlah fruktosa yang menjadi fruktosa 6-fosfat maka jumlah etanol semakin besar. Hal ini disebabkan etanol tidak hanya dihasilkan oleh glukosa tetapi juga dari fruktosa-6-fosfat.

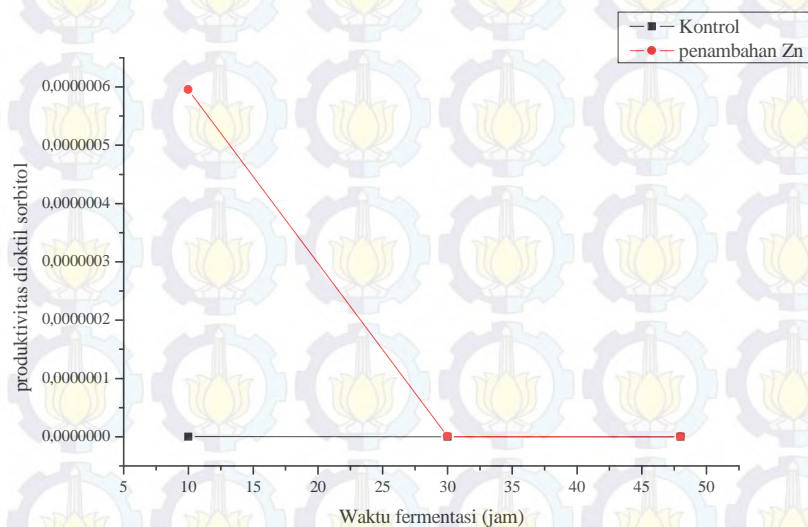


Gambar 4.35 Pola kurva yield etanol dan produktivitas dioktil sorbitol pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Sedangkan pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sorbitol paling banyak dihasilkan pada waktu fermentasi 10 jam seperti dalam medium kontrol dengan alasan yang sama yakni masih kecilnya jumlah biomassa dan melimpahnya substrat glukosa dan fruktosa. Jumlah sorbitol seiring bertambahnya waktu fermentasi semakin menurun begitu juga dengan yield etanolnya berarti terdapat produk lain yang meningkat jumlahnya seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Dugaan ini muncul sebab penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bertujuan untuk menghambat pembentukan etanol dengan cara menghambat enzim-enzim yang mengarah pada pembentukan etanol dan mengarahkan pada pembentukan sorbitol. Tujuan ini terbukti benar, seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi yield etanol semakin menurun akan tetapi jumlah sorbitol yang terbentuk ternyata semakin kecil. Produk yang diduga terbentuk dalam jumlah yang semakin meningkat tersebut adalah levan. Hal ini diindikasikan oleh kekeruhan medium yang semakin meningkat dan medium sampel lebih keruh daripada medium kontrol padahal jumlah bakteri pada medium kontrol lebih besar. Hal ini masih perlu diteliti lebih lanjut dengan cara menganalisis jumlah levan yang ada.

Penurunan jumlah dioktil sorbitol disertai pula dengan penurunan pH larutan seiring bertambahnya waktu inkubasi. Hal ini disebabkan sorbitol hanya diturunkan dari fruktosa, enzim GFOR tidak mampu mengkatalisis pembukaan cincin fruktosa sedangkan fruktosa dengan bentuk cincin terbuka terdapat hanya 0,01% dari total fruktosa yang ada (Zachariou dan Scopes, 1986). Fruktosa dengan bentuk cincin terbuka lebih stabil pada pH basa. Ketika pH larutan mulai turun akibat terbentuknya senyawa asam, fruktosa dengan cincin terbuka mengalami reaksi siklisasi menjadi fruktosa rantai tertutup. Hal ini menyebabkan semakin lama waktu inkubasi, semakin banyak asam yang dihasilkan dan semakin banyak pula fruktosa yang ada diubah menjadi fruktosa rantai tertutup sehingga sorbitol yang dihasilkan juga mulai berkurang. Hal ini terjadi pada kedua medium baik medium kontrol maupun medium yang ditambah dengan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Pengendalian pH larutan dapat meminimalisir perubahan fruktosa rantai terbuka menjadi fruktosa rantai tertutup akibat terbentuknya asam pada medium fermentasi.

Penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ terbukti dapat memperbesar hasil sorbitol (Gambar 4.36). Produktivitas sorbitol pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ lebih besar hasilnya daripada dalam medium kontrol. Produktivitas maksimumnya sama-sama dicapai pada waktu fermentasi 10 jam akan tetapi pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ jumlahnya jauh lebih besar.



Gambar 4.36 Perbandingan hasil dioktil sorbitol pada medium kontrol dan medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 1,0 g/l

BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa profil fermentasi sukrosa menjadi sorbitol oleh *Z. mobilis* galur liar serta identifikasi morfologi serta uji biokimianya adalah sebagai berikut:

1. Pemurnian stok kultur *Zymomonas mobilis* galur liar dengan teknik cawan gores 16 goresan menghasilkan kultur murni *Z. mobilis* galur liar dengan karakteristik bentuk koloni bulat, utuh, berbentuk konvek (cembung), mengkilat, dan lunak.
2. Uji biokimia terhadap kultur murni *Z. mobilis* galur liar membuktikan bahwa kultur tersebut benar-benar merupakan *Z. mobilis* dengan karakteristik merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang bersifat anaerob fakultatif, tidak membentuk spora, dapat menfermentasi sukrosa dan glukosa akan tetapi tidak dapat tumbuh maupun menfermentasi laktosa dan mannitol, menghasilkan gas pada proses fermentasi sukrosa, uji oksidase negatif, uji katalase positif, bersifat motil, tidak membentuk indol, dan termasuk *Z. mobilis* yang menghasilkan acetoin dan tidak menghasilkan gas H_2S .
3. *Z. mobilis* mempunyai fasa adaptasi (fasa lag) selama 3 jam pada media yang diaerasi sedangkan pada media yang tidak diaerasi fasa adaptasi berlangsung lebih lama yakni selama 8 jam.
4. Konsentrasi sukrosa optimum bagi pembentukan etanol adalah 300 g/l.
5. *Z. mobilis* galur liar tidak mampu tumbuh dengan baik pada penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sebesar 2,0 g/l.
6. Yield etanol pada medium kontrol semakin meningkat dengan bertambahnya waktu fermentasi sedangkan pada medium dengan penambahan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sebanyak 1,0 g/l semakin menurun dengan bertambahnya waktu fermentasi.

7. Sorbitol tidak ditemukan baik dalam medium kontrol maupun dalam medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
8. Senyawa selain sorbitol yang dapat diidentifikasi berdasarkan pola fragmentasi GC-MS adalah 5-hidroksimetilfurfural (HMF), 1,2,3,4,6-Pentakis-O-(Trimetilsilyl) hexopyranose (glucopyranose), dan 1,1-di-C-oktil-2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilyl-D-sorbitol (dioktil sorbitol).
9. Sisa fruktosa yang terdapat dalam medium mengalami reaksi maillard menjadi 5-hidroksimetilfurfural dan sisa glukosa yang ada dalam medium terdapat dalam bentuk β - D-Glucopyranose.
10. Laju pembentukan dioktil sorbitol pada medium kontrol berlawanan dengan pola pembentukan etanol. Jumlah dioktil sorbitol semakin menurun dengan bertambahnya waktu fermentasi sedangkan jumlah etanol yang dihasilkan semakin meningkat dengan bertambahnya waktu fermentasi.
11. Laju pembentukan dioktil sorbitol pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,0 g/l sejalan dengan laju pembentukan etanol. Etanol yang dihasilkan semakin menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi begitu juga dengan dioktil sorbitol yang dihasilkan. Hal ini diduga disebabkan terjadinya pembentukan levan yang meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi.
12. Penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,0 g/l mampu menghambat pembentukan etanol dan memperbesar dioktil sorbitol yang dihasilkan.

5.2 Saran

1. Masih perlunya penelitian lebih lanjut tentang asal pembentukan dioktil sorbitol di dalam proses fermentasi sukrosa oleh *Z. mobilis* galur liar.
2. Masih perlunya uji levan di dalam supernatan hasil fermentasi.
3. Masih perlu dilakukan proses optimasi di dalam proses analisa sorbitol sehingga tidak terjadi reaksi samping seperti reaksi maillard.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Prosedur Kerja

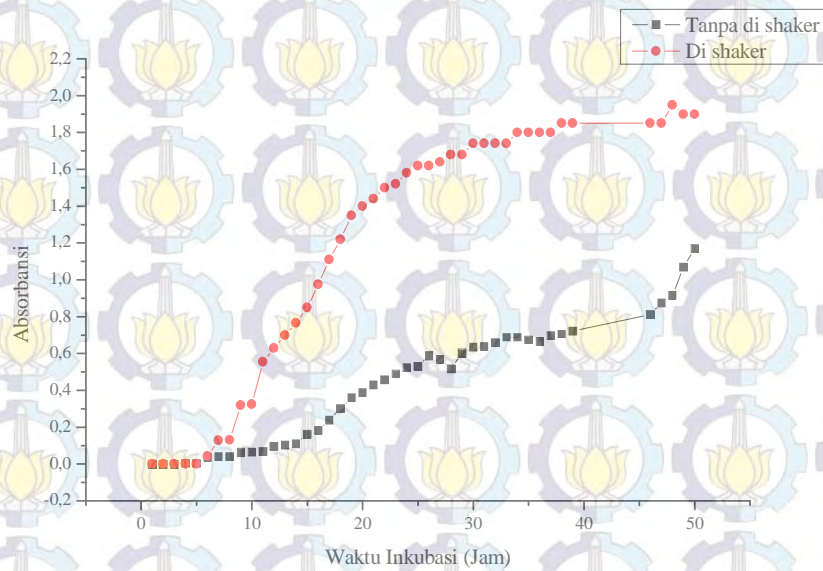


Lampiran 2. Kurva Pertumbuhan *Zymomonas mobilis* galur liar Jepang

Tabel 3.1 Pengukuran absorbansi medium yang dishaker dan tanpa dishaker

Jam ke-	Absorbansi	
	tidak dishaker	Shaker
1	0,000	0,000
2	0,001	0,001
3	0,001	0,001
4	0,005	0,001
5	0,005	0,001
6	0,037	0,044
7	0,039	0,129
8	0,040	0,131
9	0,063	0,319
10	0,064	0,325
11	0,069	0,554
12	0,096	0,630
13	0,104	0,700
14	0,110	0,766
15	0,163	0,850
16	0,183	0,975
17	0,240	1,110
18	0,303	1,220
19	0,359	1,350
20	0,388	1,400
21	0,430	1,440
22	0,458	1,500
23	0,492	1,520
24	0,524	1,580
25	0,532	1,620
26	0,588	1,620
27	0,568	1,640
28	0,518	1,680
29	0,602	1,680
30	0,634	1,740
31	0,638	1,740
32	0,660	1,740
33	0,690	1,740
34	0,690	1,800

35	0,676	1,800
36	0,664	1,800
37	0,698	1,800
38	0,706	1,850
39	0,722	1,850
46	0,812	1,850
47	0,876	1,850
48	0,915	1,950
49	1,070	1,900
50	1,170	1,900



Gambar 3.1 Kurva Pertumbuhan *Zymomonas mobilis* Galur Liar

Lampiran 3. Perhitungan Residu Glukosa

Perhitungan kadar glukosa diukur dengan kalibrasi kurva standard glukosa sebagai berikut:

Tabel 3.2 Pengukuran absorbansi glukosa standard

konsentrasi glukosa (ppm)	absorbansi
20	0,046
40	0,115
60	0,181
80	0,261
100	0,339



Gambar 3.2 Kurva Standard Glukosa

Tabel 3.3 Perhitungan % residu glukosa *Z. mobilis* galur liar tanpa penambahan Zn

waktu	absorbansi	residu glukosa (ppm)	% residu glukosa	% glukosa terpakai
a	e	$f = [(e + 0,0312) / 0,0037] \times 100$	$f / 10000$	
0	1,875	51.518,92	5,15	-
10	0,595	16.924,32	1,69	3,46
20	0,575	16.383,78	1,64	3,51
30	0,551	15.735,14	1,57	3,58
40	0,49	14.086,49	1,41	3,74
48	0,451	13.032,43	1,30	3,85

Tabel 3.4 Perhitungan % residu glukosa *Z. mobilis* galur liar dengan penambahan Zn sebesar 1 g/l

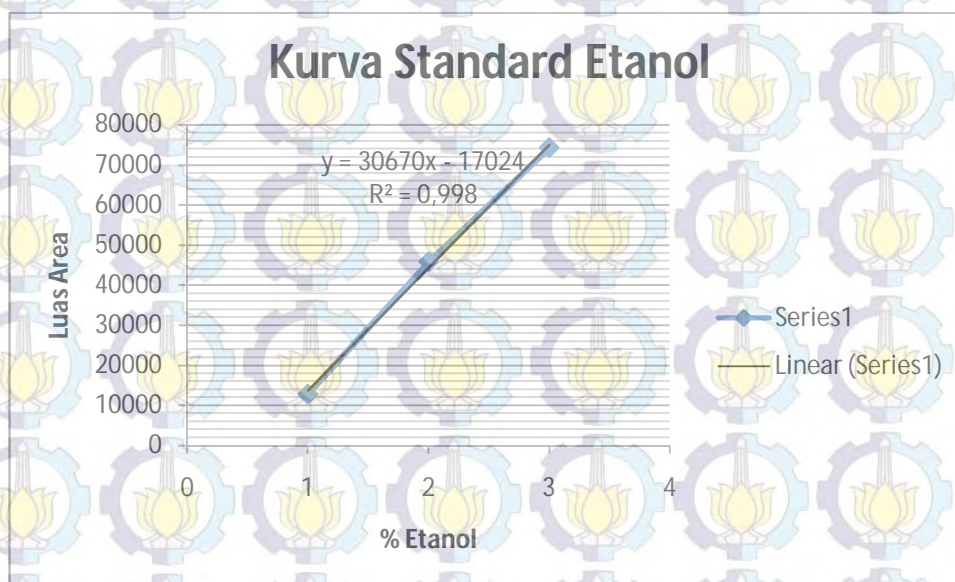
waktu	absorbansi	residu glukosa (ppm)	% residu glukosa	% glukosa terpakai
a	e	$f = [(e + 0,0312) / 0,0037] \times 100$	$f / 10000$	
0	1,875	51.518,92	5,15	-
10	1,73	47.600,00	4,76	0,39
20	1,62	44.627,03	4,46	0,69
30	0,63	17.870,27	1,79	3,36
40	0,452	13.059,46	1,31	3,85
48	0,398	11.600,00	1,16	3,99

Lampiran 4. Perhitungan Kadar Etanol

Perhitungan kadar etanol diukur dengan kalibrasi kurva standard etanol sebagai berikut:

Tabel 3.5 Pembuatan Kurva Standard Etanol

Etanol (%)	Luas Area
1	12889
2	45828
3	74228



Gambar 3.3 Kurva Standard Etanol

Tabel 3.6 Perhitungan % Etanol Hasil Fermentasi Sukrosa 300 g/l Tanpa Penambahan Zn

Waktu Fermentasi (jam)	% Etanol	Volume destilat (ml)	Volume etanol (ml)	Massa Etanol
a	b	c	d = b x c	e = d x 0,7893
10	0,44	0,80	0,35	0,28
30	0,37	2,20	0,81	0,64
48	0,41	4,70	1,93	1,52

Tabel 3.7 Perhitungan % Etanol Hasil Fermentasi Sukrosa 300 g/l dengan Penambahan Zn sebesar 1 g/l

Waktu Fermentasi (jam)	% Etanol	Volume destilat (ml)	Volume etanol (ml)	Massa Etanol
a	b	c	$d = b \times c$	$e = d \times 0,7893$
10	0,079	1,60	0,13	0,10
30	0,172	1,30	0,22	0,18
48	0,183	1,30	0,24	0,19

Lampiran 5. Perhitungan Jumlah Biomassa

Tabel 3.8 Penghitungan Biomassa

Waktu fermentasi (jam)	biomassa tanpa penambahan Zn (kontrol)			
	Jumlah bakteri (CFU)	pengenceran	volume inokulasi	Total ($\times 10^8$ CFU/ml)
10	120	10.000	10 μ L	1,2
20	152	10.000	10 μ L	1,5
30	231	10.000	10 μ L	2,3
40	282	10.000	10 μ L	2,8
48	424	10.000	10 μ L	4,2

Waktu fermentasi (jam)	biomassa dengan penambahan Zn			
	Jumlah bakteri (CFU)	pengenceran	volume inokulasi	Total (CFU/ml)
10	140	10	10 μ L	$1,4 \times 10^5$
20	30	10^3	10 μ L	3×10^6
30	279	10^3	10 μ L	$2,8 \times 10^7$
40	229	10^4	10 μ L	$2,3 \times 10^8$
48	90	10^4	10 μ L	9×10^7

Lampiran 6. Perhitungan Yield dan Produktivitas (Laju Pembentukan) Etanol

Tabel 3.9 Perhitungan Yield dan Produktivitas *Z. mobilis* galur liar tanpa penambahan Zn (kontrol)

Waktu Fermentasi (jam)	Massa Etanol	% glukosa terpakai	yield = g etanol/g glukosa	Yield	Produktivitas (g/l/jam)
a	g	h	$I = (g/h)$	$j = i \times 2 \times \frac{100}{100}$	$k = (g \times 10) / a$
10	0,28	3,46	0,08	16,06	0,28
30	0,64	3,58	0,18	35,91	0,21
48	1,52	3,85	0,40	79,04	0,32

Tabel 3.10 Perhitungan Yield dan Produktivitas *Z. mobilis* galur liar dengan penambahan Zn sebesar 1 g/l

Waktu Fermentasi (jam)	Massa Etanol	% glukosa terpakai	yield = g etanol/g glukosa	Yield	Produktivitas (g/l/jam)
a	g	h	$I = (g/h)$	$j = i \times 2 \times \frac{100}{100}$	$k = (g \times 10) / a$
10	0,10	0,39	0,25	50,92	0,10
30	0,18	3,36	0,05	10,49	0,06
48	0,19	3,99	0,05	9,41	0,04

Lampiran 7. Perhitungan Kemampuan Bakteri Memproduksi Etanol

Tabel 3.11 Perhitungan kemampuan bakteri tanpa dan dengan penambahan Zn dalam menghasilkan etanol selama 48 jam

Perlakuan	Massa Etanol	Jumlah bakteri	massa etanol/bakteri
	a	b	$c = a / b$
kontrol	1,52	$4,2 \times 10^8$	$3,6 \times 10^{-9}$
penambahan Zn	0,19	$0,9 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{-9}$

Lampiran 8. Tabel data waktu retensi dan kadar senyawa hasil derivatisasi pada medium kontrol

NO puncak senyawa	waktu inkubasi kontrol					
	10		30		48	
	waktu retensi	% area	Waktu retensi	% area	Waktu retensi	% area
1	5,6	1,956	5,6	1,356	5,6	2,58
2	6,0	0,476	6,0	0,639	6,0	0,869
3	6,9	2,882	6,9	2,283	6,9	2,901
4	7,4	3,785	7,4	2,909	7,4	4,219
5	7,6	1,263	7,6	1,073	7,6	1,489
6	7,9	0,209	9,1	0,334	9,3	1,141
7	9,2	0,642	9,3	0,251	10,5	2,125
8	10,4	1,593	10,4	1,416	10,6	1,261
9	10,6	1,288	10,6	0,994	12,3	14,211
10	11,2	0,496	11,2	0,758	13,2	0,632
11	11,7	0,213	12,2	7,664	13,4	1,934
12	12,1	5,335	12,3	5,202	13,9	4,693
13	12,3	5,207	13,3	1,454	14,0	0,648
14	13,3	1,538	13,5	0,685	14,3	4,52
15	13,4	0,844	13,6	0,566	14,4	1,232
16	13,6	0,388	13,8	3,24	14,8	1,274
17	13,8	3,631	14,0	0,7	15,0	0,95
18	14,0	0,274	14,3	4,093	15,4	0,445
19	14,3	3,853	14,4	1,637	16,8	0,718
20	14,4	1,548	14,6	0,551	17,0	0,943
21	14,6	0,543	14,8	0,995	17,6	1,603
22	14,8	1,259	15,0	0,754	17,8	0,892
23	15,0	0,962	15,4	0,357	17,9	3,561
24	15,4	0,351	16,8	0,95	18,3	0,467
25	15,8	0,204	17,0	0,796	19,0	5,599
26	16,8	0,996	17,6	1,367	19,9	4,889
27	17,0	0,988	17,7	0,473	21,1	1,757
28	17,6	1,663	17,9	3,027	21,3	2,887
29	17,8	1,696	18,0	0,324	22,3	0,654
30	17,9	3,075	18,2	0,333	32,2	0,544
31	18,0	0,483	18,4	0,494	32,3	0,514
32	18,2	0,325	18,5	0,346	32,7	2,859
33	18,3	0,252	19,0	8,136	33,1	1,094
34	18,4	0,648	19,9	4,125	33,3	1,933
35	18,5	0,451	21,1	1,367	33,5	3,472

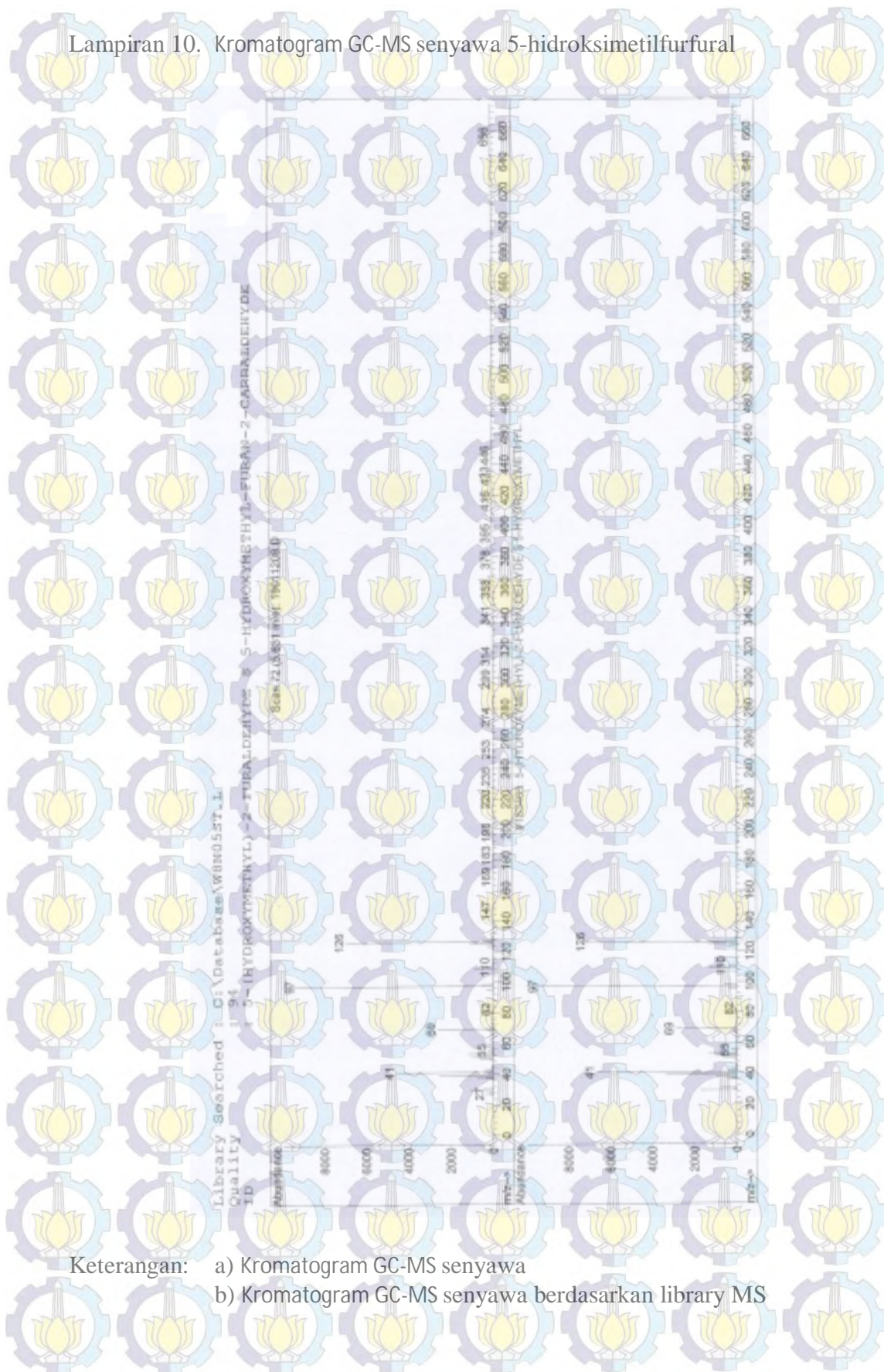
36	19,0	6,55	21,3	2,376	33,6	0,668
37	19,8	4,154	22,3	0,458	33,7	1,631
38	20,1	0,404	32,0	0,3	33,8	2,279
39	21,0	1,483	32,1	0,64	34,1	4,09
40	21,3	2,479	32,3	0,51	34,2	1,531
41	22,3	0,429	32,7	3,378	34,4	4,225
42	32,0	0,203	33,1	1,323	34,6	0,593
43	32,1	0,497	33,3	2,23	34,7	1,096
44	32,3	0,375	33,5	2,907	34,9	1,717
45	32,7	2,875	33,6	0,786	35,6	0,672
46	33,0	1,023	33,7	1,585		
47	33,3	1,812	33,8	2,539		
48	33,5	3,038	34,1	3,471		
49	33,6	0,543	34,2	1,923		
50	33,7	1,512	34,5	4,83		
51	33,8	2,425	34,6	0,971		
52	34,1	3,472	34,7	1,033		
53	34,2	1,795	34,9	4,631		
54	34,4	5,294	35,2	1,196		
55	34,6	0,702	35,4	0,784		
56	34,7	1,237	35,7	0,482		
57	34,9	4,581	-	-		
58	34,4	0,92	-	-		
59	34,7	0,88				

Lampiran 9. Tabel data waktu retensi dan kadar senyawa hasil derivatisasi pada medium dengan penambahan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,0 g/l

NO puncak senyawa	waktu inkubasi sampel					
	10		30		48	
	waktu retensi	% area	Waktu retensi	% area	Waktu retensi	% area
1	5,6	2,092	5,8	6,841	5,6	2,061
2	6,0	0,697	6,1	0,624	6,0	0,651
3	6,9	2,389	7,0	2,479	6,9	1,773
4	7,4	3,359	7,5	5,837	7,4	3,659
5	7,6	1,04	7,6	1,512	7,6	1,433
6	9,2	0,4	9,3	0,625	9,3	1,02
7	10,5	1,63	10,5	2,468	10,5	1,984
8	10,6	0,859	10,6	1,594	10,6	1,243
9	11,2	0,427	11,2	0,56	11,2	0,622
10	12,3	11,084	11,7	0,484	12,3	13,615
11	13,2	0,511	12,3	15,117	13,4	1,759
12	13,3	1,771	13,2	0,631	13,5	0,512
13	13,8	4,028	13,3	1,666	13,9	4,284
14	14,3	4,184	13,9	4,156	14,1	0,671
15	14,4	0,618	14,3	3,242	14,3	4,536
16	14,6	0,444	14,4	0,761	14,4	1,389
17	14,8	1,049	14,8	1,157	14,8	1,263
18	15,0	0,889	15,0	1,139	15,0	1,02
19	16,8	0,395	16,8	1,111	15,4	0,485
20	17,2	4,407	17,0	0,915	16,8	0,713
21	17,7	3,65	17,7	2,087	17,1	1,015
22	17,9	4,826	17,9	2,614	17,6	1,673
23	18,2	3,655	18,0	1,369	17,8	1,29
24	18,4	0,839	18,4	0,953	17,9	3,712
25	18,5	1,854	19,0	8,966	18,3	0,455
26	18,6	1,803	19,4	15,967	18,4	0,728
27	19,1	6,096	19,8	3,071	18,6	0,426
28	19,5	7,376	21,0	1,349	19,0	2,488
29	19,9	4,804	21,3	1,873	19,9	4,864
30	20,2	0,334	22,3	0,33	21,1	1,811
31	20,7	0,601	33,4	1,707	21,3	3,026
32	21,1	0,789	33,6	0,552	22,3	0,51
33	21,1	0,926	33,8	0,783	32,2	0,58
34	21,3	2,351	34,0	1,895	32,3	0,475
35	22,3	0,833	34,3	2,199	32,7	3,093

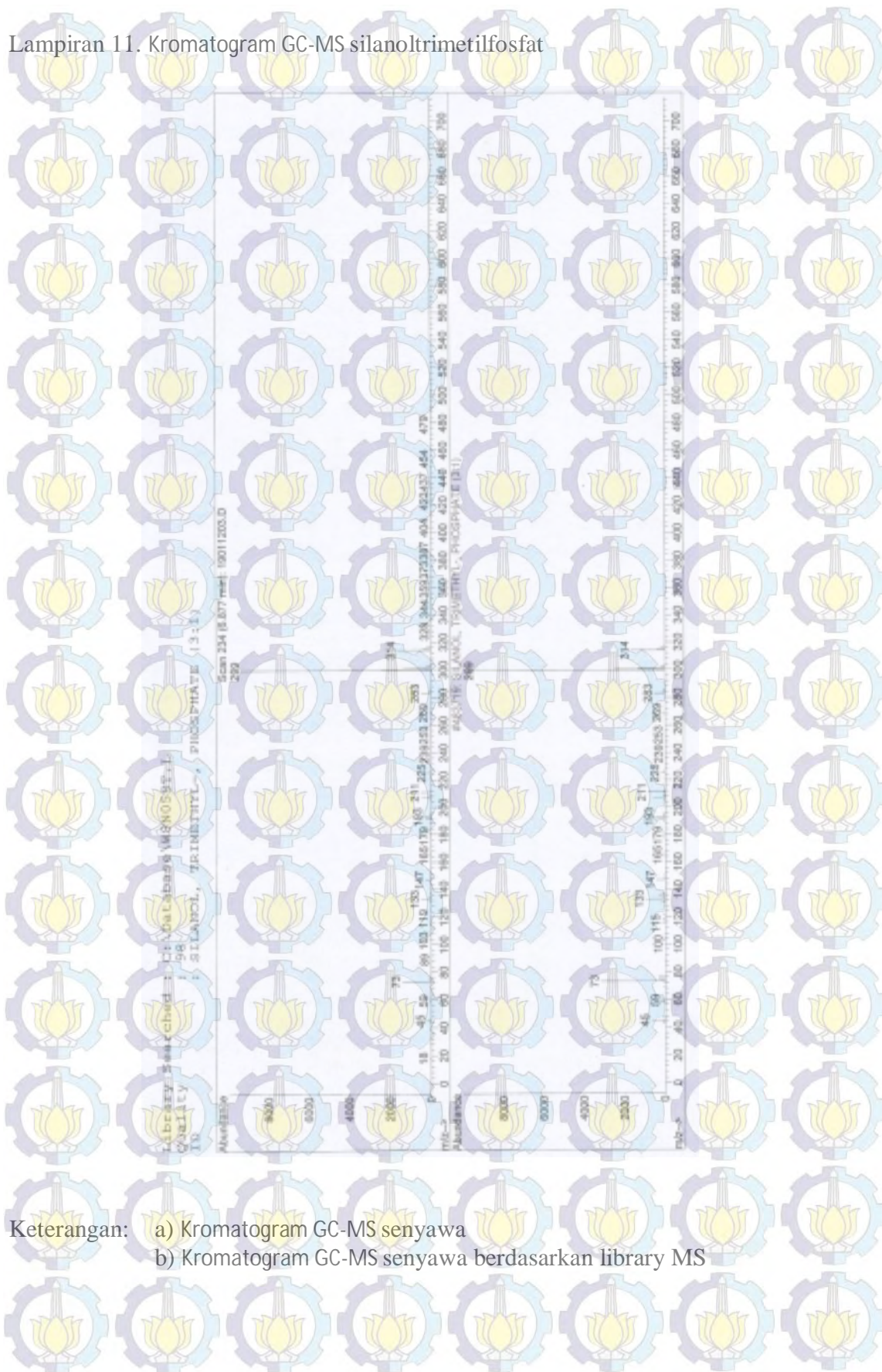
36	32,3	0,369	34,6	1,363	33,0	1,044
37	32,7	1,54			33,3	1,89
38	33,0	0,545			33,5	5,133
39	33,3	0,976			33,6	0,952
40	33,4	1,511			33,7	1,549
41	33,7	0,939			33,8	2,605
42	33,8	1,35			34,1	4,076
43	34,0	2,453			34,2	1,818
44	34,3	3,101			34,4	1,943
45	34,8	2,626			34,6	0,809
46	35,1	0,444			34,7	0,969
47	35,4	0,378			34,9	5,073
48	35,7	0,758			35,4	0,597
49					35,7	0,7

Lampiran 10. Kromatogram GC-MS senyawa 5-hidroksimetilfurfural



Keterangan: a) Kromatogram GC-MS senyawa
b) Kromatogram GC-MS senyawa berdasarkan library MS

Lampiran 11. Kromatogram GC-MS silanoltrimetilfosfat



Keterangan: a) Kromatogram GC-MS senyawa
b) Kromatogram GC-MS senyawa berdasarkan library MS

Lampiran 12. Kromatogram GC-MS senyawa 1,1-di-C-oktil-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-D-sorbitol



Keterangan: a) Kromatogram GC-MS senyawa
 b) Kromatogram GC-MS senyawa berdasarkan library MS

Lampiran 13. Kromatogram GC-MS senyawa D-1,2,3,4,6-pentakis-O-trimetilsilyl-
heksopyranose (glucopyranose)



Keterangan: a) Kromatogram GC-MS senyawa
b) Kromatogram GC-MS senyawa berdasarkan library MS

Lampiran 14. Kromatogram GC Sorbitol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 10 jam

File : I:\MSDChe\1\DATA\SORBITOL2\19011201.D
 Operator : C001
 Acquired : 24 Jan 2012 16:41 using AcqMethod: SORBITOL-2.M
 Instrument : Instrument #1
 Sample Name: Kontrol 10' Teta-1
 Misc Info :
 Vial Number: 6



Lampiran 15. Kromatogram GC Sorbitol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 10 jam



Lampiran 16. Kromatogram GC Sorbitol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 30 jam

File : C:\MSDChe\1\DATA\SORBITOL2\19011205.D
 Operator : CD01
 Acquired : 24 Jan 2012 19:21 using AcqMethod SORBITOL-2.M
 Instrument : Instrument #1
 Sample Name: Kontrol 30' Teta-1
 Misc Info :
 Vial Number: 8

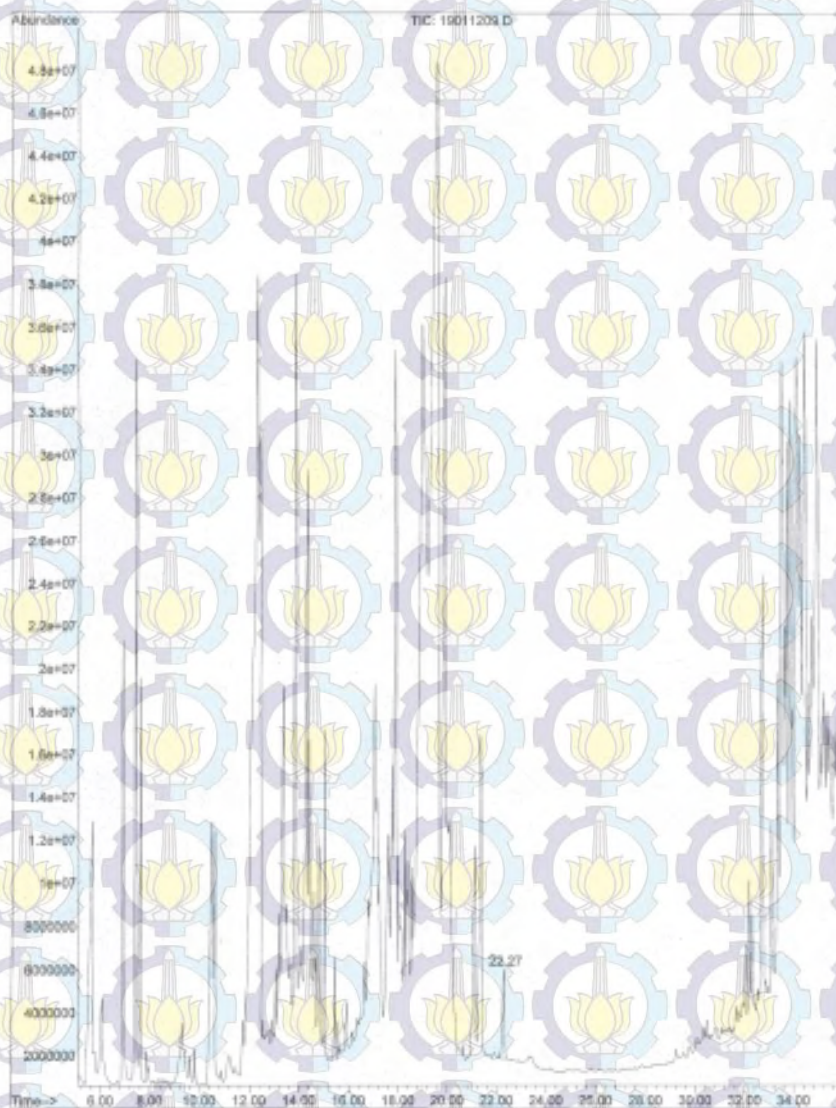


Lampiran 17. Kromatogram GC Sorbitol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 30 jam



Lampiran 18. Kromatogram GC Sorbitol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 48 jam

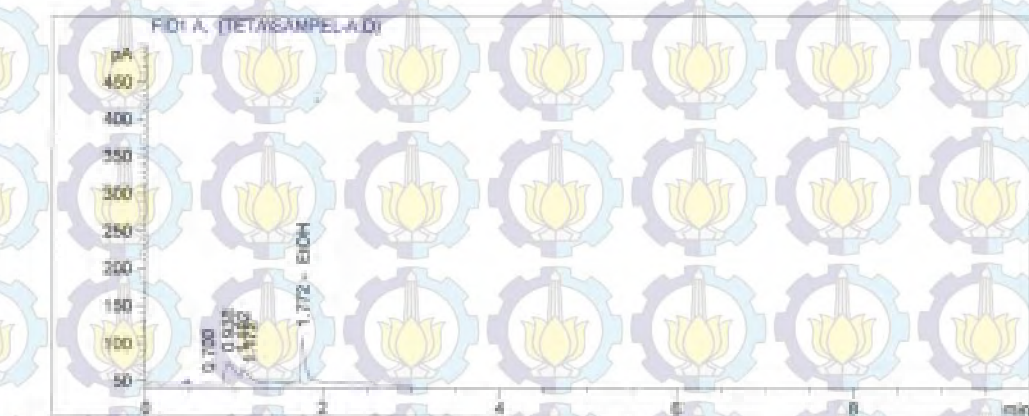
File : C:\MSDChe\1\DATA\SORBITOL2\19011209.D
 Operator : C001
 Acquired : 24 Jan 2012 22:02 using AcqMethod: SORBITOL-2.M
 Instrument : Instrument #1
 Sample Name: Kontrol 48^h Teta-1
 Misc Info :
 Vial Number: 10



Lampiran 19. Kromatogram GC Sorbitol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 48 jam



Lampiran 20. Kromatogram GC etanol pada medium sukrosa 200 g/l dengan waktu inkubasi 24 jam



Data File C:\HPCHEM\1\DATA\TETA\SAMPEL-A.D Sample Name: SAMPEL-A SUK200

Instrument: 1 12/21/2011 4:03:14 AM

HP-POSAFLOT-Q04-1uL

Injection Date : 12/21/2011 3:59:28 AM

Sample Name : SAMPEL-A SUK200

Location : Vial 1

Acq. Operator :

Inj : 1

Inj Volume : Manually

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOH.M

Last changed : 12/21/2011 4:02:10 AM

(modified after loading)

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOH.M

Last changed : 12/21/2011 4:03:14 AM

(modified after loading)

External Standard Report (Sample Amount is 0.1)

Sorted By : Signal

Calib. Data Modified : 12/21/2011 4:02:40 AM

Multiplier : 1.0000

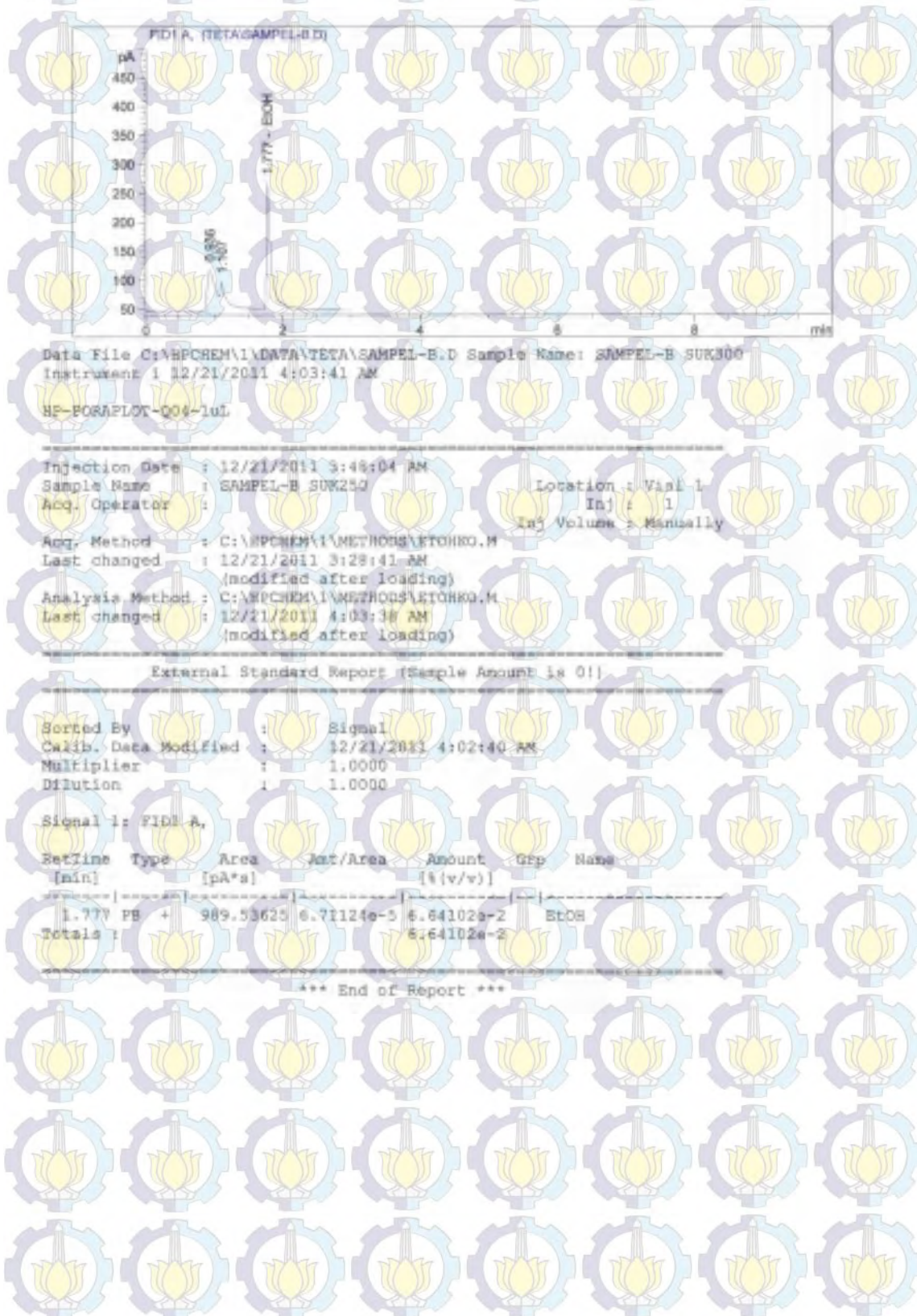
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A₁

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Ant/Area	Amount [%(v/v)]	Grp	Name
1.172	FB	224.96860	6.71124e-5	1.50982e-2		EtOH
Totals :				1.50982e-2		

*** End of Report ***

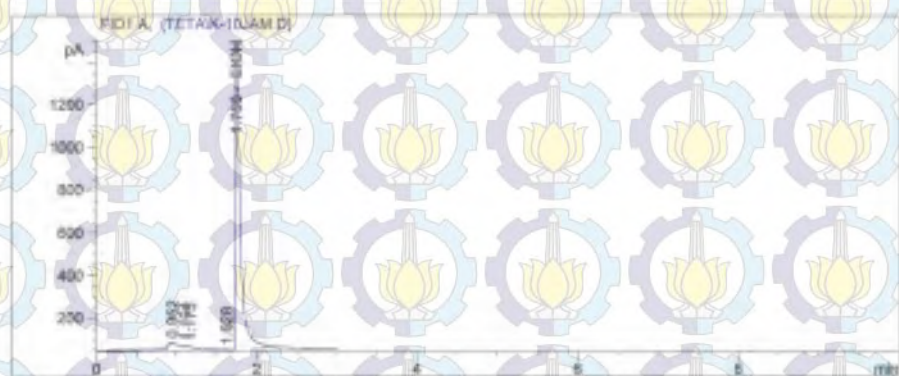
Lampiran 21. Kromatogram GC etanol pada medium sukrosa 250 g/l dengan waktu inkubasi 24 jam



Lampiran 22. Kromatogram GC etanol pada medium sukrosa 300 g/l dengan waktu inkubasi 24 jam



Lampiran 23. Kromatogram GC etanol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 10 jam



Data File C:\HPCHEM\1\DATA\TETAK-10JAM.D Sample Name: KONTROL 10 JAM
Instrument 1 1/3/2012 2:26:50 AM
HP-PORAPLOT-Q04-1uL

Injection Date : 1/3/2012 2:19:04 AM
Sample Name : KONTROL 10 JAM Location : Vial 1
Acq. Operator : Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOH.M
Last changed : 1/3/2012 2:18:10 AM
(modified after loading)

External Standard Report (Sample Amount is 01)

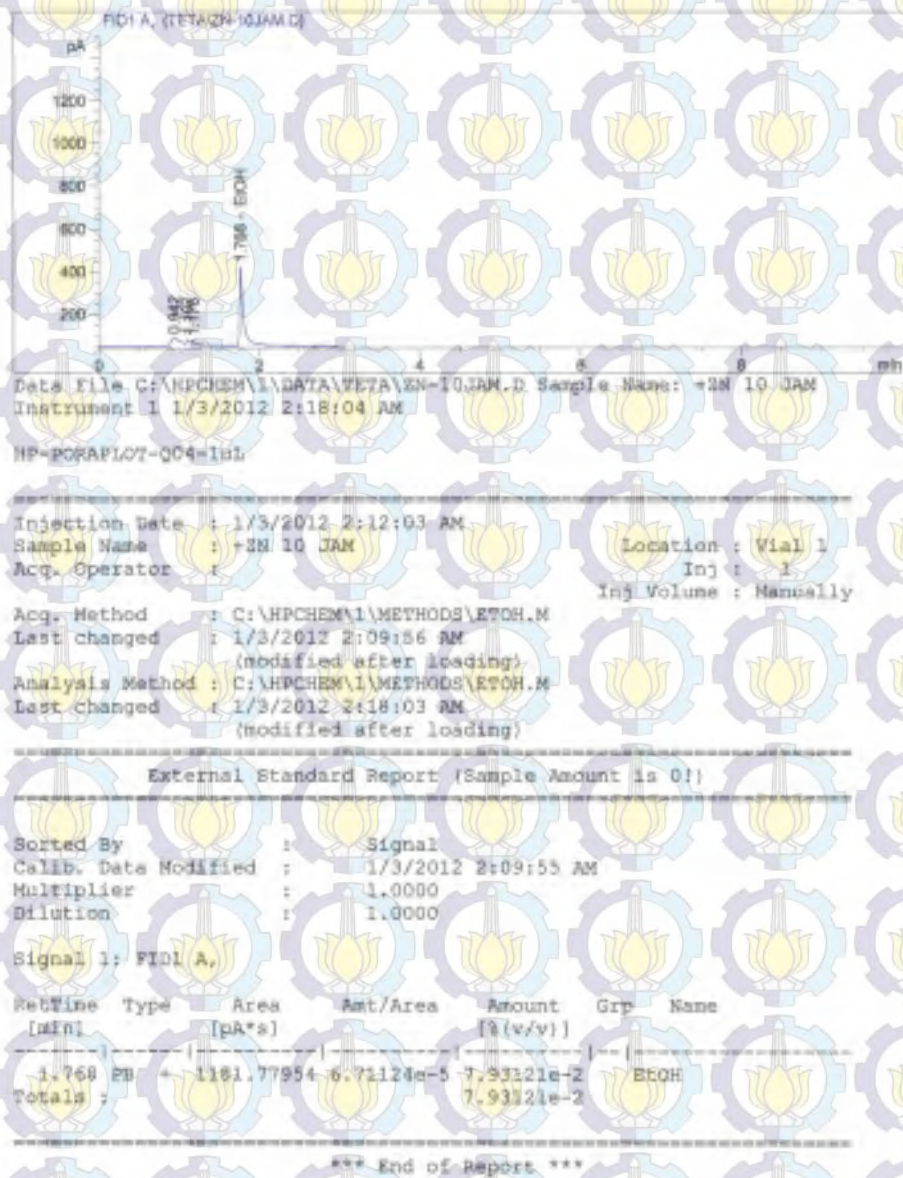
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 1/3/2012 2:18:07 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

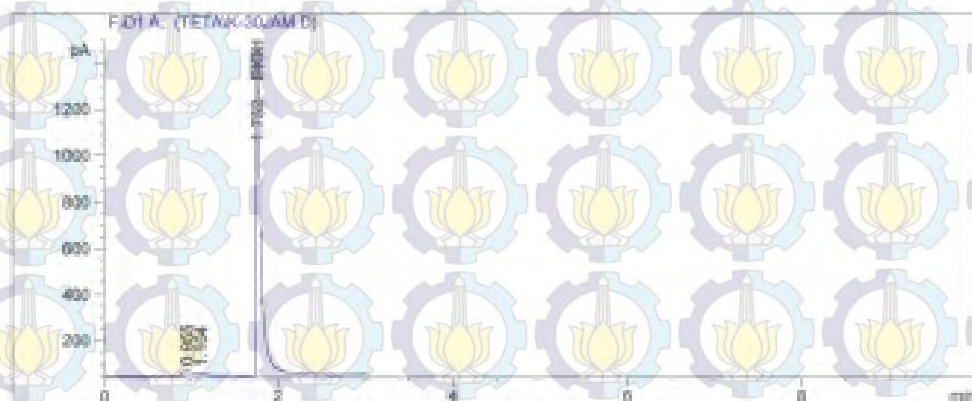
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Ant/Area	Amount [g (v/v)]	Grp	Name
1.750	PK 3+	6561.99219	6.71124e-5	4.40391e-1		EtOH
Totals :				4.40391e-1		

*** End of Report ***

Lampiran 24. Kromatogram GC etanol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 10 jam



Lampiran 25. Kromatogram GC etanol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 30 jam



Data File C:\HPCHEM\1\DATA\TETA\N-30JAM.D Sample Name: KONTROL 30 JAM
Instrument 1 1/3/2012 2:51:05 AM

HP-PORAPLOT-Q04-1uL

Injection Date : 1/3/2012 2:45:10 AM
Sample Name : KONTROL 30 JAM
Acq. Operator : Location : Visi 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOH.M
Last changed : 1/3/2012 2:18:10 AM
(modified after loading)

External Standard Report (Sample Amount is 0!)

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 1/3/2012 2:18:07 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A.

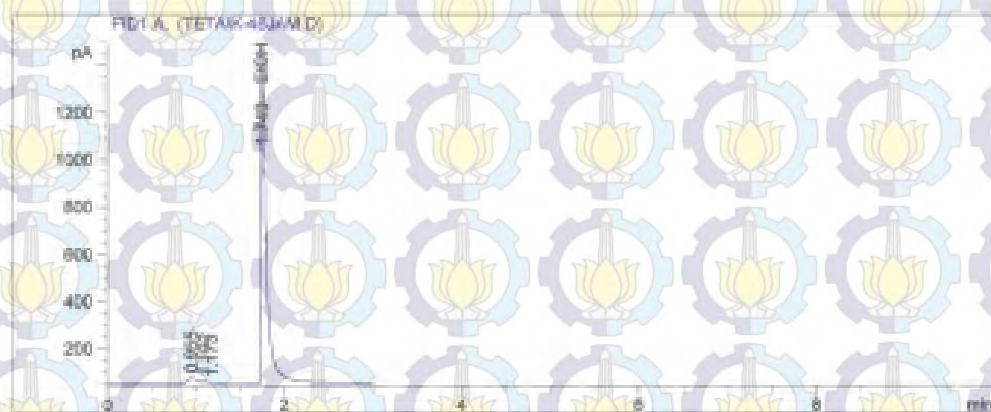
RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Ant/Area	Amount [g(v/v)]	Grp Name
1.752	PK	5573.47754	6.71124e-5	3.74050e-1	EtOH
Totals :				3.74050e-1	

*** End of Report ***

Lampiran 26. Kromatogram GC etanol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 30 jam



Lampiran 27. Kromatogram GC etanol pada medium kontrol dengan waktu inkubasi 48 jam



Data File G:\HPCHEM\1\DATA\TETA\K-48JAM.D Sample Name: KONTROL 48 JAM
Instrument 1 1/3/2012 3:03:45 AM

HP-PCAPLOT-Q04-1uL

Injection Date : 1/3/2012 2:52:01 AM
Sample Name : KONTROL 48 JAM Location : Vial 1
Acq. Operator : Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOH.M
Last changed : 1/3/2012 2:18:10 AM
(modified after loading)

External Standard Report (Sample Amount is 0!)

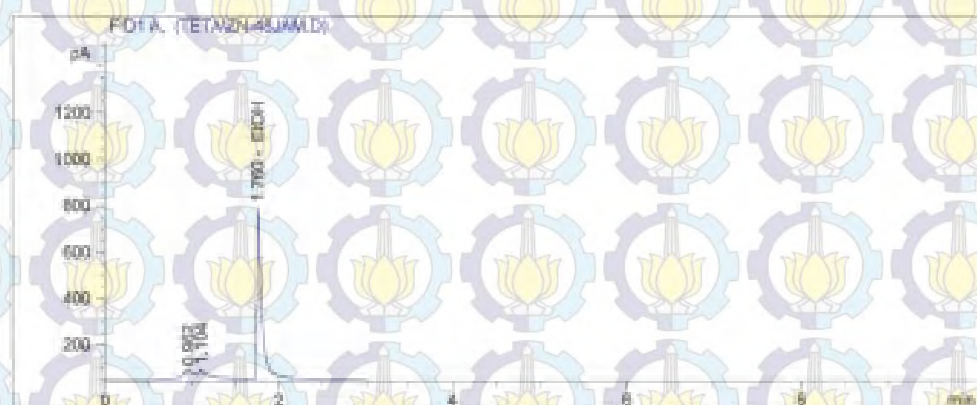
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 1/3/2012 2:18:07 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Ant/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.749	PK 8+	6244.89600	6.71124e-5	4.19110e-1		ETOH
Totals :				4.19110e-1		

*** End of Report ***

Lampiran 28. Kromatogram GC etanol pada medium sampel dengan waktu inkubasi 48 jam



Data File C:\HPCHEM\1\DATA\TETRAZN-48JAM.D Sample Name: +ZN 48 JAM
Instrument 1 1/3/2012 3:11:22 AM

HP-PORAPLOT-Q04-1uL

Injection Date : 1/3/2012 3:04:57 AM Location : Vial 1
Sample Name : +ZN 48 JAM Inj : 1
Acq. Operator : Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOH.M
Last changed : 1/3/2012 2:18:10 AM
(modified after loading)

External Standard Report (Sample Amount is 0!)

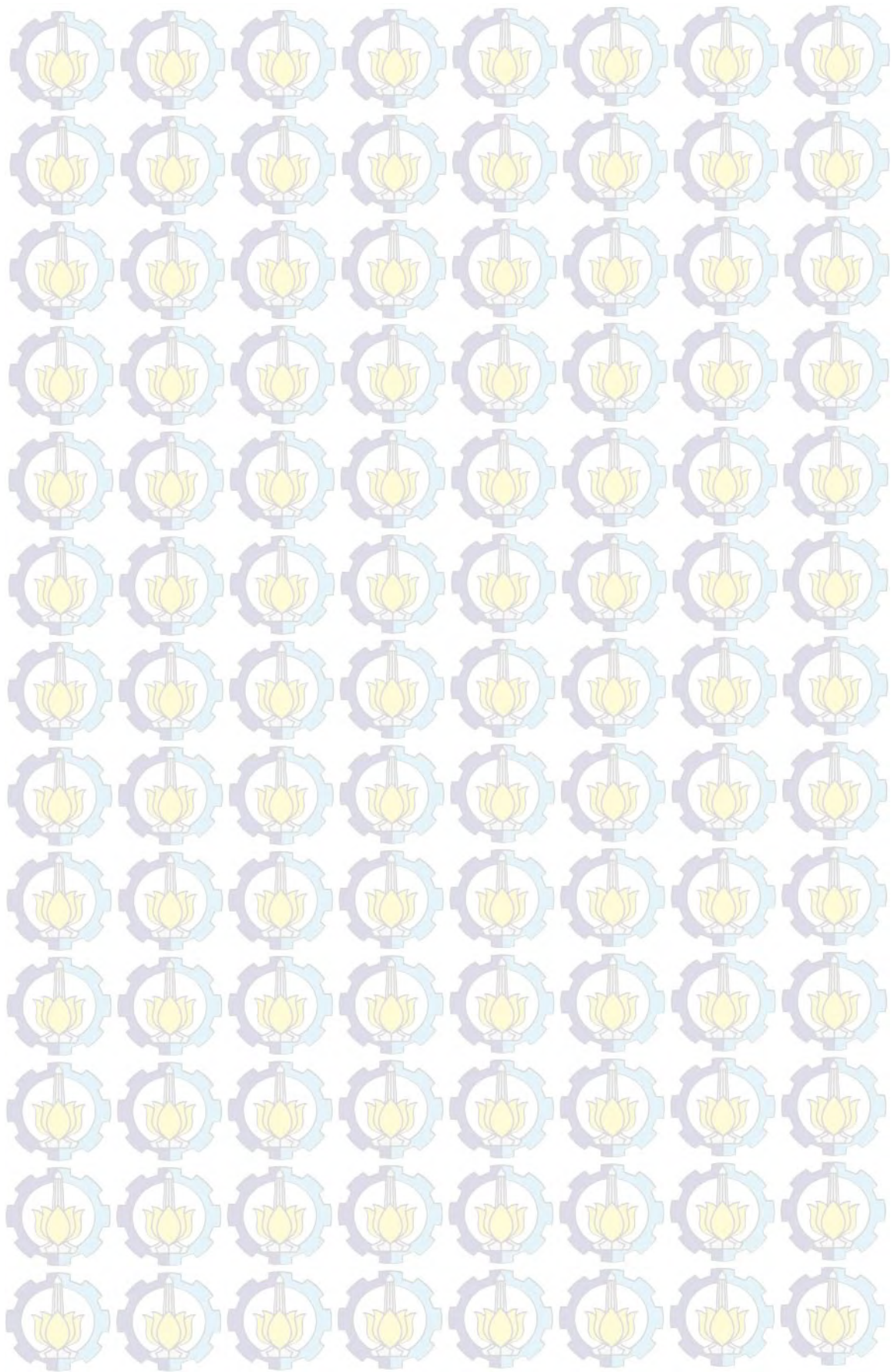
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 1/3/2012 2:18:07 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

RetTime (min)	Type	Area [pA*s]	Int/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
1.760	PK	2732.58887	6.71124e-5	1.83391e-1		EtOH
Totals :				1.83391e-1		

*** End of Report ***

“halaman ini sengaja dikosongkan”

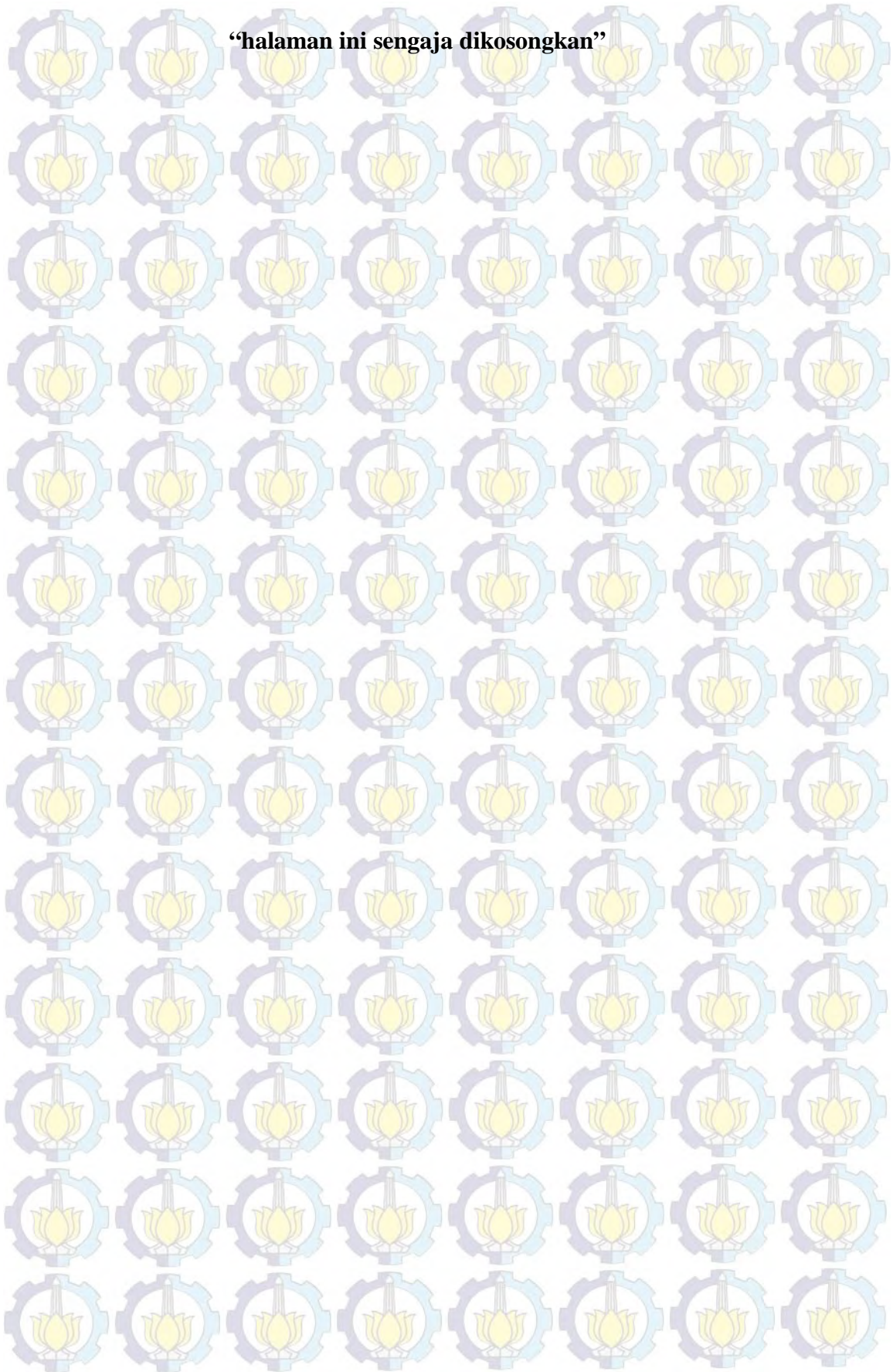


BIOGRAFI PENULIS



Penulis dilahirkan di Sidoarjo pada tanggal 27 Desember 1982, sebagai anak keempat dari enam bersaudara. Penulis adalah alumnus dari TK Wachid Hasyim Sedati-Sidoarjo, Madrasah Ibtidaiyah Wachid Hasyim Sedati-Sidoarjo, SMP Negeri 1 Juanda dan SMU Negeri 1 Waru. Setelah menempuh pendidikan Menengah Atas, penulis melanjutkan ke pendidikan tinggi jurusan kimia fakultas MIPA di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) pada bulan Agustus 2001. Penulis menamatkan studi di Jurusan Kimia MIPA dengan mengambil Tugas Akhir pada Bidang Biokimia dan berhasil lulus dengan predikat sangat memuaskan pada bulan Maret 2006. Penulis menikah pada tanggal 3 Juli 2009 dan telah dikaruniai seorang putri. Penulis kembali meneruskan studi jenjang S2 di jurusan kimia ITS pada bulan Agustus 2009 dan sempat mengambil cuti studi selama satu semester. Penulis menamatkan studi di jurusan kimia MIPA dengan mengambil thesis pada Bidang Biokimia dan berhasil lulus pada bulan maret 2012.

“halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR PUSTAKA

Adnan, Mochamad. (1997), *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*, edisi pertama, ANDI, Yogyakarta.

Anderson, R. J. dan G. A. Howard, (1974), "The production of hydrogen sulphide by yeast and by *Zymomonas anaerobia*", Journal Inst. Brewery, London, no. 80, hal. 245-21.

Barnet, M. dan J. Venghaus, (1993), "Microbiology Laboratory Exercises", Second edition, Wm. C. Brown Publishers, London.

Barrow, K.D., Collins, J.G., Leigh, D.A., Rogers, P.L., Warr, R.G. (1984), "Sorbitol Production by *Zymomonas mobilis*" Journal Applied Microbiology Biotechnology, No.20, hal 225-233.

Belaich, J. P. dan J. C. Senez, (1965), "Influence of aeration and Panthotenate on growth yield of *Zymomonas mobilis*", Journal Bcteriology, no. 95, hal. 1750-1757.

Bringer, S., R. K. Finn dan H. Sahm, (1984), "Effect of Oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*", Archives of Microbiology, No. 139, hal. 376-381.

Cappuccino, J.G. dan Sherman, N., (2001), "Microbiology A Laboratory Manual", Benjamin Cummings, San Fransisco.

Chang, A., M., Grote, A., Schomburg, L., Schromburg, D., (2009), "BRENDA AMENDA and BRENDA the enzyme information system: new content and tools, Nucleic Acids Res, No.37, 588-592.

Collins, C. H, dan Lyne, P. M, (1985), "Microbiological Methods", Edisi kelima, Butterworth and Co.

Daads, M. J. S dkk., (1973), "The doubtful status of the species *Zymomonas anaerobia* dan *Z. mobilis*", Journal App. Bacteriology, no. 36, hal. 531-539.

De Ley dan Swings J., (1976), " Phenotype description, numerical analysis and a proposal for an improved taxonomy and nomenclature fo the dan Van Niel", International Sys. Bacteriology, no. 26, hal. 146-157.

Doelle, H.W. (1982), "Kinetics Characteristics and Regulatory Mechanism of Glucokinase and Fructokinase from *Zymomonas mobilis*", European Journal of Applied Microbiology Biotechnology, No.14, hal 241-246.

Dwijoseputro, (2005), "Dasar-Dasar Mikrobiologi", Djambatan, Malang.

Eriksson, Sune, (2005), "Acrylamide in Food Product: Identification, Formation and Analytical Methodology", Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Sweden.

Girindra, Aisjah, (1990), "Biokimia 1", PT.Gramedia, Jakarta.

Gunasekaran, P., T. Karunakaran dan M. Kasthuribai, (1986), "fermentation Pattern of *Zymomonas mobilis* Strains on Different Substrate-a Comparative Study", Journal Bioscience, no. 2 hal. 181-186.

Harley dan Prescott, (2002), "Laboratory Exercises in Microbiology", McGraw-Hill Company.

Harper, H.A., (1973), "Review of Physiological Chemistry, 14th edition, Lange Medical Publication, California.

Horwitz, W., (1975), "Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C), AOAC Washington, Twelfth edition.

Irianto, K. (2007), "Mikrobiologi" Yrama Widya, Bandung.

Johnson, T.R. dan Case, C.L, (2004), "Laboratory Experiments in Microbiology", seventh edition, Pearson Education inc., San Francisco.

Lay, B., (1994), "Analisis Mikroba di Laboratorium", Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Lee, W. C. dan Huang, C. T, (2000), "Modeling of Ethanol Fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 on the Media Containing Glucose and Fructose", Biochemical Engineering Journal, No.4, hal 217-227.

Lewis, R.J., (1989), "Food Additives Handbook", Van Nostrand Reinhold, New York.

Liu, C., Dong, H., Zhong, J., Ryu, D.D.Y. dan Bao, J. (2010), "Sorbitol Production Using Recombinant *Zymomonas mobilis* Strain", Journal of Biotechnology, No.148, hal 105-112.

Loos, H., Kramer, R., Sahm, H. dan Sprenger, G.A. (1994), "Sorbitol Promotes Growth of *Zymomonas mobilis* in Environments with High Concentration of Sugar: Evidence for a Physiological Function of Glucose-Fructose Oxidoreductase in Osmoprotection", Journal of Bacteriology, Vol.176, No.24, hal 7688-7693.

Marie, S. dan Piggot, J. R., (1991), "Handbook of Sweetener", Van Nostrand Reinhold, New York.

Milis, N. F., (1956), "A Study of the Cider Sickness Bacillus-a new variety of *Zymomonas anaerobia*", J. Gen. Microbiology, no. 15, halaman 521-528.
Swings J and Deley J, (1977), "The biology of *Zymomonas mobilis*", Bacteriol Rev 1977.

Miller, G.L. (1959), "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Analytical Chemistry, No.31, hal 426-428.

Mogosanu, G. D., dkk., (2011), "Identification of Sugar from *Silene Albae* Herba using GC-MS Technique", U.P.B Sci. Bull., Series B, Vol. 73, Iss.2.

Page, D. S., (1997), "Prinsip Prinsip Biokimia", Edisi kedua, Erlangga, Jakarta.

Ranatunga, T. D., dkk., (1997), " Identification of Inhibitory Components Toxic Toward *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) Xylose Fermentation", Humana Press.Inc.

Sasahara, H. dan Ken Izumori, (2005), " Production of L-Sorbitol from L-Fructose by *Aureobasidium pullulans* LP23 Isolated from Soy Sauce Mash", Journal of Bioscience and Bioengineering", Vol.100, No.2, hal.223-226.

Schlegel, H. G, (1994), "Mikrobiologi Umum", Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Shimwell, J. L. (1937), " Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium* sp.nov) producing alcoholic fermentation of glucose", Journal Inst. Brew. London, no. 43, hal 507-509.

Swings J and Deley J, (1977), "The biology of *Zymomonas mobilis*", Bacteriol Rev 1977.

Viikari, Liisa, (1984), "Formation of Sorbitol by *Zymomonas mobilis*", Applied Microbiology Biotechnology, 20, 118-123.

Viikari, L. dan Gisler, R., (1986), Applied Microbiology Biotechnology, 23, 240-244.

Walaas, E., (1958), Acta Chemica Scandinavica, No. 12, hal. 528.

Walaas, E., dan Otto Walaas, (1962), "The Activation of Muscle Hexokinase by Divalent Metal Ions", Acta Chemica Scandinavica, No. 16, hal. 1682-1694.

Waluyo, L., (2007), "Mikrobiologi Umum", UMM Press, Malang.

Zachariou, M. dan Scopes, R.K. (1986), "Glucose-Fructose Oxireductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production" *Journal of Bacteriology*, hal 863-869.